UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

FACULTÉ DES SCIENCES de MARSEILLE

N° D'ORDRE : 24

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

Faculté des Sciences de Marseille

POUR L'OBTENTION DU

GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Nguyen-van THOAI

CHARGÉ DE RECHERCHES AU CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE.

1re Thèse : **Spécificité des Enzymes.** Aperçu critique sur la conception actuelle de la spécificité dans le domaine de l'enzymologie suivi d'un exposé de recherches sur la chimie des Phosphatases.

2me Thèse : **Propositions données par la Faculté.**

Soutenues le 10 AVR. 1946, **devant la Commission d'examen**

MM. P. CHOUX, *Président.*
J. ROCHE,
G. MORIN, } *Examinateurs.*
P. DESNUELLE,

LONS-LE-SAUNIER
IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

1946

UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

FACULTÉ DES SCIENCES de MARSEILLE

N° D'ORDRE : 29

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

Faculté des Sciences de Marseille

POUR L'OBTENTION DU

GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Nguyen-van THOAI

CHARGÉ DE RECHERCHES AU CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE.

1re Thèse : **Spécificité des Enzymes.** Aperçu critique sur la conception actuelle de la spécificité dans le domaine de l'enzymologie suivi d'un exposé de recherches sur la chimie des Phosphatases.

2me Thèse : **Propositions données par la Faculté.**

Soutenues le 10 AVR. 1946, **devant la Commission d'examen**

MM. P. CHOUX, *Président.*
J. ROCHE,
G. MORIN, } *Examinateurs.*
P. DESNUELLE,

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

1946

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

FACULTÉ DES SCIENCES DE MARSEILLE

Mort au champ d'honneur :
M. F. R. MARTY
Maître de conférences de Mathématiques
(14 juin 1940).

Doyen et Professeur honoraire : M. MARCHAUD.

Professeurs honoraires : MM. : CAULLERY, Ch. FABRY, J. PERES, J. COTTE, H. BIERRY.

Doyen : E. TRAYNARD. *Assesseur :* P. CHOUX.

Secrétaire : H. LANFRANCHI.

Professeurs :

MM.	P. SEVE	Physique industrielle.
	A. TIAN	Chimie générale.
	M. KOLLMANN	Zoologie générale.
	J. BOSSLER	Astronomie.
	E. TRAYNARD	Calcul différentiel et intégral.
	L. MARGAILLAN	Chimie industrielle.
	G. CORROY	Géologie et Minéralogie.
	P. CHOUX	Botanique générale.
	E. RAYMOND	Chimie P. C. B.
	R. THYRY	Mécanique rationnelle et mécanique des fluides.
	G. PETIT	Biologie animale.
	H. PRAT	Biologie végétale.
	P. ROUARD	Physique générale.
	N	Physiologie.
	R. CERIGHELLI	Agronomie coloniale.

Chargé de Cours :

M.	G. MORIN	Physiologie.

Maîtres de Conférences :

MM.	C. JAUSSERAN	Physique P. C. B.
	E. BLANC	Mathématiques.
	L. SACKMANN	Mécanique des fluides.
	P. DESNUELLE	Chimie biologique et corps gras.

Chargés de Conférences :

MM.	Ct ROUCH	Océanographie.
	J. ROCHE	Chimie biologique.
Mme	TAXY-FABRE	Géographie physique et Géologie appliqué.
MM.	E. CALVET	Chimie.
	J. TIMON-DAVID	Zoologie agricole.
	A. FAVRE	Météréologie.
	G. MALCUIT	Botanique appliquée.

Maîtres de Conférences honoraires :

MM. E. MEISSONNIER
L. LAURENT
H. BIMAR
D. RICARD.

A MES PARENTS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J. ROCHE

PREMIÈRE PARTIE.

Aperçu critique sur la conception actuelle de la spécificité dans le domaine de l'Enzymologie.

INTRODUCTION.

L'ensemble des conditions nécessaires à l'évolution d'une réaction définit sa spécificité, c'est-à-dire ses limites. Cette notion, longtemps considérée comme s'appliquant surtout aux phénomènes biologiques, est en réalité très générale et la phrase d'Emile DUCLAUX : « ce qui rendait la théorie de LIEBIG inféconde, c'est qu'elle répudiait en principe la notion de spécificité » [121] n'est plus actuelle, car la spécificité des réactions en milieu chimiquement défini est parfois aussi étroite que celle des processus enzymatiques. En fait la notion de spécificité conçue dans son sens le plus large et non pas restreint, comme d'ordinaire, à la spécificité de substrat, s'applique aussi bien aux réactions entre corps purs qu'à celles servant de support à des phénomènes biologiques d'apparence très complexe. C'est ainsi que par exemple les acquisitions récentes de l'enzymologie laissent prévoir que les phénomènes qui assurent la transmission des caractères héréditaires et la persistance de l'espèce eux-mêmes se réduisent à des « réactions métaboliques d'ordre supérieur » [BUTENANDT].

Du point de vue cinétique, l'action enzymatique, catalyse en milieu microhétérogène, dirige l'évolution générale d'un système chimique en accélérant inégalement des réactions simultanées. De ce fait la notion enzymatique apparaît comme essentiellement quantitative et liée à la vitesse. Cette *spécificité relative* est un fait général et la *spécificité absolue* constitue un cas limite que l'on rencontre lorsque le système ne présente pas de réactions secondaires. C'est ainsi que l'absence de concurrence entre l'hydrolyse des liaisons C—O—C ; —CO—O—C ; —CO—NH— et la rupture des chaînes carbonées délimite nettement les hydrolases et les desmolases. En raison même de leur nature, les fonctions esters ne sont pas décomposées selon le même mécanisme que les liaisons osidiques et la spécificité des enzymes actifs sur elles est forcément absolue. Ainsi la *spécificité de groupe* c'est-à-dire celle se limitant à un type de fonction chimique, sert-elle de base à la classification des enzymes.

Le véritable aspect de la spécificité se présente dans toute sa complexité et toute sa fécondité lorsqu'il est envisagé de manière plus étroite pour un groupement chimique déterminé, la catalyse portant sur des corps de constitution analogue, se transformant à des vitesses comparables. Il s'établit alors entre ces vitesses et les diverses variables du système (structures fines des substrats, conditions physiques telles que température, pH ; activateurs et inhibiteurs spécifiques) des relations qui caractérisent le mécanisme de la réaction. La purification et l'isolement des enzymes, les critères de spécificité tirés de l'étude cinétique des réactions permettent d'identifier des systèmes enzymatiques définis ; l'existence d'une *spécificité individuelle*, c'est-à-dire propre à un seul substrat, peut être alors envisagée et la connaissance de la structure chimique de l'enzyme permet de délimiter le rôle des constituants de ce dernier dans les diverses phases de la réaction.

On peut envisager la catalyse enzymatique comme le fait d'une succession d'équilibres :

$$\text{Apoe} + \text{Coe} \rightleftarrows \text{E} \qquad (1)$$

$$\text{E} + \text{S} \rightleftarrows \text{E S} \qquad (2)$$

$$\text{ES} \rightleftarrows \text{E} + \text{s} + \text{s}' \qquad (3)$$

dont le premier régit la concentration en enzymes [E], le second la combinaison enzyme-substrat [ES] et le troisième l'activité enzymatique présidant à la transformation du substrat S en ses produits de dégradation s et s'. Exprimant la transformation du substrat depuis son entrée en combinaison avec l'enzyme actif (E) jusqu'à la libération des produits finaux de la catalyse, le jeu des trois réactions précédentes doit exiger la satisfaction de toutes les conditions délimitant la spécificité. *Tout facteur modifiant la vitesse de l'une ou de l'autre, influence nécessairement la vitesse de l'ensemble. Celle-ci est l'expression cinétique de la spécificité. Aussi sa mesure et la connaissance de ses variations doivent-elles permettre de caractériser l'enzyme et les réactions qui lui sont propres.*

Les trois équilibres (1), (2), (3), peuvent, en première approximation, être considérés comme l'expression générale des réactions qui régiraient les différences de spécificité enzymatique. Les interprétations des faits relevant de ces dernières sont nombreuses et dispersées dans les travaux originaux. Il n'existe pas encore dans les traités d'enzymologie récents un essai de coordination des divers aspects de la spécificité enzymatique et le comportement des catalyseurs biologiques à l'égard du substrat, du pH, des activateurs et des inhibiteurs n'a fait jusqu'ici

l'objet que d'interprétations particulières dont la signification générale ne se dégage pas.

Dans l'exposé que nous nous proposons de faire, nous avons cherché à donner des explications communes à des phénomènes apparemment dissemblables, relevant toutes de la spécificité. Nous avons essayé de rattacher au jeu des équilibres (1), (2), (3) l'extrême diversité des réactions qui traduisent généralement l'influence sur la spécificité des enzymes, de la constitution du susbtrat, du pH et des effecteurs.

CHAPITRE I.

EXPRESSIONS GÉNÉRALES DE LA SPÉCIFICITÉ ENZYMATIQUE.

La définition classique de la spécificité d'un enzyme par rapport à son substrat n'explicite pas la nature des transformations mises en jeu par une catalyse enzymatique déterminée. L'état des composants enzymatiques, en fonction non seulement de la concentration du substrat, mais également de celle des ions H^+ et des effecteurs, les multiples possibilités réactionnelles d'un milieu aussi complexe constituent autant de caractéristiques qui différencient les divers enzymes. La spécificié de ceux-ci doit être précisée par le jeu, *particulier à chacun d'eux,* des trois équilibres

$$\text{Apoe} + \text{Coe} \rightleftarrows \text{E} \quad (1)$$

$$\text{E} + \text{S} \rightleftarrows \text{E S} \quad (2)$$

$$\text{ES} \rightleftarrows \text{E} + \text{S} + \text{s'} \quad (3)$$

Nous étudions successivement l'influence de chacune de ces réactions dans le déterminisme de la spécificité enzymatique.

I. — Spécificité enzymatique et constitution des substrats.

Des relations de structure entre l'enzyme et le substrat ont été établies pour la première fois par Fischer, plus de trente ans après la découverte par Pasteur de l'attaque préférentielle de l'acide tartrique droit, par les microorganismes. Pasteur écrivait en 1858 : « Si la levure est naturellement constituée par des matières dissymétriques, elle ne s'accommodera pas à un degré égal d'un aliment qui est lui-même dissymétrique dans le même sens ou en sens inverse » [343]. En 1894, E. Fischer n'exprimait pas une opinion différente lorsqu'il comparait l'adaptation de l'invertase et de l'émulsine à leur substrat et celle d'une clef à une serrure [145].

A. — Aspects divers du problème.

1° *Spécificité d'un enzyme vis-à-vis de la réaction catalysée.*

Les relations entre la configuration du substrat et celle de l'enzyme ne peuvent être précisées que si la spécificité *de groupe* a été définie car l'influence des détails structuraux sur la spécificité n'apparaît nettement que pour une réaction ou une suite de réactions déterminées. Il arrive parfois que deux séries de réactions fournissent des produits finaux semblables ou présumés tels, à partir des mêmes corps ; dans ce cas l'attribution à un même système enzymatique de deux mécanismes catalytiques différents fausse la notion de spécificité. Des confusions de cet ordre sont pourtant fréquentes à propos d'enzyme assurant la réversibilité de l'équilibre :

$$S \rightleftarrows s + s'$$

C'est ainsi que la formation du révertose à partir du glucose a été pendant longtemps attribuée à la maltase de levure [**112**] alors qu'elle semble être due à l'action de la révertase qui accompagne celle-ci [**356**]. Il est de même probable que la synthèse du maltose et celle de l'isomaltose sont le fait non d'un enzyme unique mais de deux enzymes inégalement répartis dans la levure et l'émulsine d'amandes douces [**19**]. De même la distinction de systèmes hydrolysants et de système synthétisants affirmée par Rosenthaler à propos de la Carboligase [**378**], par Braidford, Robertson dans la protéosynthèse et par v. Euler à propos des phosphatases résulte d'une fausse interprétation de faits, consistant soit à attribuer à une action enzymatique des effets chimiques spontanés, soit à désigner sous le même terme plusieurs mécanismes réactionnels [**132, 137**].

Les différences observées au cours de la dégradation et de la synthèse proviennent en général de la présence d'impuretés dont l'influence plus prononcée sur les réactions lentes de synthèse donne souvent naissance à des réactions secondaires. Ainsi les irrégularités de la synthèse et de l'hydrolyse des esters du cholestérol dans le sérum sont dues vraisemblablement à l'action simultanée de la cholestérase et d'une autre estérase [**408, 407**], en particulier de la lécithase B [**278**]. De même la distinction par Kiessling [**237**] dans la protéine C d'un constituant phosphorylant et d'un autre glycogélytique, assurant la réversibilité de l'équilibre :

$$\text{glycogène} + PO_4^{---} \rightleftarrows \text{ester de Cori}$$

semble devoir être rapportée à la présence de quantités infimes

de glycogène jouant comme l'acide adénylique le rôle de constituant essentiel de la phosphorylase [99, 102, 103].

La purification, qui généralement augmente le pouvoir hydrolysant des enzymes, a souvent pour résultat d'altérer ou de faire disparaître leur activité synthétisante, ce qui conduit également à envisager l'existence d'enzymes spécifiques de chaque sens de l'équilibre enzymatique

$$ES \rightleftarrows E + s + s'.$$

Ce fait peut tenir à l'absence d'effecteurs dont l'action varie selon le sens de la réaction. Par exemple un milieu réducteur favorise la protéolyse et la présence d'oxydants, la condensation protéique en élevant le potentiel d'oxydoréduction [365, 366]. De même il existe un activateur de la lipase dont la forme réduite stimule l'hydrolyse des esters et la forme oxydée leur synthèse [213, 214, 216, 234]. Récemment nous avons pu mettre en évidence la présence dans les macérations d'amandes douces d'activateurs naturels de la β glucosidase et dont l'élimination au cours de la purification explique la diminution du pouvoir synthétisant de l'émulsine [426]. L'existence d'activateurs de synthèse permet ainsi d'expliquer les variations apparentes de spécificité relatives aux deux réactions inverses de la catalyse enzymatique signalées dans certains cas.

Il ne semble pas exister de système hydrolysant distinct du système synthétisant pour une réaction d'équilibre déterminée. Hanriot, Pottevin, Kastle pour les lipases [185, 227, 353], Bourquelot et ses élèves [78, 79, 80, 81, 87], Bayliss [60], Josephson [224] pour les carbohydrases ont montré nettement par l'étude cinétique et l'identification des produits de synthèse que la catalyse d'une réaction donnée est assurée dans les deux sens par le même enzyme. Il en est de même pour les desmolases dont toutes, sauf la catalase et la carboxylase qui intéressent des réactions irréversibles, favorisent les réactions inverses. L'emploi du suffixe *ase* pour désigner les enzymes assurant la synthèse enzymatique apparaît comme injustifié lorsque la réaction étudiée est nettement définie. Ces exemples montrent que la *spécificité de groupe*, basée sur des réactions distinctes doit être précisée avant d'aborder le problème de la *spécificité individuelle*, qui marque les relations entre le substrat et l'enzyme.

2° *Spécificité d'un enzyme vis-à-vis des substrats (spécificité individuelle).*

L'nfluence de la constitution du substrat sur la spécificité individuelle se manifeste sous de multiples aspects. Pour de nom-

breuses observations accumulées depuis les débuts de l'enzymologie l'image de Fischer constitue encore l'explication la plus claire. Dans les cas les plus complexes on en est réduit à enregistrer les variations de l'action enzymatique qu'entraînent les modifications de la constitution du substrat. On constate que l'enzyme se montre spécifique soit à l'égard de tous les substrats voisins, soit vis-à-vis d'un seul d'entre eux. Avec les protéines où la structure des acides aminés semble jouer un rôle moins important que l'agencement général de l'édifice moléculaire, la spécificité des enzymes (pepsine, trypsine, papaïne, cathepsine) est encore mal définie. Certaines globulines (toxines diphtérique p. ex.) ne sont pas attaquées par la pepsine dans les conditions où les albumines sont facilement digérées et cela pour des raisons non encore précisées. Avec les poly- et dipeptides, les différences de structure fine : le nombre [167], la longueur [197], la configuration optique [68, 170] des acides aminés commandent la vitesse d'hydrolyse. Avec les esters où l'acide minéral ou organique comme l'alcool ou le phénol offrent une grande diversité, les estérases se subdivisent en une multitude d'enzymes particuliers qui présentent une action plus ou moins prononcée sur un certain type de constituant déterminé. Ainsi dans le cas des lipases, le nombre [316], la longueur [427], le degré d'insaturation [328], la configuration optique [16, 26, 375, 444, 456, 457] des restes d'acides révèlent des caractères tout à fait particuliers de l'enzyme [38, 48, 209, 226, 289, 316, 317, 427]. De même les cholestérases estérifient le cholestérol et le dihydrocholestérol, mais non le stigmatérol ni l'ergostérol [394]. La longueur de la chaîne carbonée, le degré d'insaturation des acides gras régissent également la vitesse de déshydrogénation de ces derniers [277, 61]. L'influence de la configuration spatiale et du caractère stéréochimique est surtout accentuée dans le cas des carbohydrases, dont la spécificité ne peut être rapportée exclusivement ni à la nature des liaisons osidiques, ni à la constitution des oses présents dans l'oside [191, 446]. C'est l'ensemble de la configuration du glucide qui commande la spécificité enzymatique et celle-ci se modifie graduellement à chaque détail structural nouveau. Près d'un demi-siècle après Fischer, Bergmann, essayant de définir la spécificité immunochimique en est réduit à admettre, sans plus de précision, que les haptènes en entiers et non seulement quelques atomes ou quelques groupements atomiques entrent en combinaison avec les plages de fixation de l'anticorps [68].

3° *Spécificité d'un enzyme à l'égard des facteurs énergétiques.*

Une analyse plus poussée montre que non seulement les caractères spatiaux et électrochimiques des substrats exercent leur influence sur la spécificité de l'enzyme mais que l'énergie électrique intramoléculaire du métabolite fait sentir également ses effets. La spécificité des déhydrases est déterminée à la fois par la structure du donateur d'hydrogène et par son état énergétique ainsi que par celui de l'accepteur d'hydrogène. Le transport de l'hydrogène est lié au potentiel d'oxydo réduction du milieu. Vis-à-vis d'un système à haut potentiel tel que le couple succinate-fumarate, le bleu de méthylène peut servir de transporteurs d'hydrogène mais il n'en est pas de même du glutathion ou de la lactoflavine dont le potentiel normal est négatif.

L'ensemble de ces faits montre la multiplicité des aspects que peut revêtir l'influence du substrat sur la spécificité enzymatique. L'état actuel de nos connaissances ne permet pas évidemment de rattacher *en détail* toutes ces variations aux trois réactions générales décrites plus haut. Toutefois l'intérêt de la cinétique des processus enzymatiques montre l'importance de celle-ci dans l'explication d'un grand nombre de faits ; elle nous met par ailleurs en mesure d'apprécier la part qui revient aux divers constituants de l'enzyme dans le déterminisme de la spécificité.

B. — Facteurs cinétiques composant la spécificité enzymatique.

La spécificité d'un enzyme vis-à-vis de son substrat est due à deux facteurs, qui semblent relever de la constitution dualiste de l'enzyme : la fixation du substrat sur l'enzyme grâce à certains groupements fonctionnels de celui-ci et la décomposition du produit intermédiaire grâce à ses groupements actifs.

1° *Affinité de la combinaison enzyme-substrat.*

La combinaison de l'enzyme au substrat, qui constitue la première phase de la réaction, est définie par la constante de dissociation de la combinaison Enzyme-Substrat (ES) km ou de son inverse k_M.

$$E + S \underset{km}{\overset{kM}{\rightleftarrows}} ES$$

Après Michaelis, Euler, Willstaetter, Kuhn et leurs écoles

ont appliqué les mesures de l'affinité à la détermination de la spécificité enzymatique, en particulier à propos des carbohydrases (saccharase, amylase) et des lipases. Toutefois, NORTHROP n'a pas pu mettre en évidence de cette façon l'existence d'une combinaison Protéase-Protéine [308, 333].

Il est possible de déterminer ce qui peut modifier l'affinité de l'enzyme pour le substrat, et par conséquent les influences qui altèrent la spécificité du ferment. Ainsi, les inversions de spécificité optique de la lipase hépatique, à la suite des variations de concentration en substrat [26] peuvent être attribuées à un phénomène de solubilité [16], qui intervient directement sur la saturation de l'enzyme en substrat. La masse moléculaire, les encombrements stériques, les caractères électrochimiques, déterminent des modifications analogues d'affinité [277, 38] et expliquent les multiples variations de spécificité que nous avons citées plus haut. De même dans les réactions d'immunochimie, la spécificité relative semble être due à des modifications d'affinité [66] qui dépendent de la nature et de la disposition des acides aminés de l'haptène, les acides aminés terminaux des chaînes peptidiques ayant un rôle prépondérant. Dans le cas de la papaïne, la présence d'un groupement aminé libre diminue l'affinité [67].

2° *Dislocation de la combinaison enzyme-substrat.*

L'affinité ne traduit cependant pas toujours la spécificité de l'enzyme vis-à-vis d'un substrat déterminé. La vitesse et le mode de dislocation du produit Enzyme-Substrat qui caractérisent la deuxième phase de la réaction enzymatique conditionnent également la spécificité.

En effet l'enzyme peut dégrader des composés voisins à des vitesses différentes tout en présentant la même affinité pour tous. Ainsi l'estérase du pancréas de porc dont l'affinité pour les d. et l. mandélates d'éthyle est égale, hydrolyse le dérivé gauche plus rapidement que son énanthiomorphe [375, 441, 456, 457]. Ces réactions asymétriques, observées pour la première fois par DAKIN [113], s'expliquent par la formation de diastéréoisomères intermédiaires. Si l'on admet, par exemple, pour un catalyseur actif la forme droite dE, on aboutit aux combinaisons suivantes [266].

$$dA + dE \longrightarrow dAdE \longrightarrow dBdE.$$
$$lA + lE \longrightarrow lAdE \longrightarrow lBdE.$$

La vitesse de transformation du diastéréoisomère détermine finalement la spécificité optique de l'enzyme. Une explication

analogue a été suggérée récemment par MICHEEL [312] pour interpréter l'inégale isomérisation des acides aminés au cours de l'hydrolyse des protéines des tissus normaux ou cancéreux.

Non seulement la vitesse, mais le mode de rupture du complexe Enzyme-Substrat détermine aussi la spécificité enzymatique. L'α et la β amylase diffèrent entre elles non par leur affinité vis-à-vis de l'amidon, mais parce que la première rompt la molécule du polyoside dans la profondeur des chaînes fondamentales alors que la deuxième l'hydrolyse à partir de leurs extrémités [383]. Dans le cas des desmolases, où les transformations sont souvent conditionnées par le potentiel d'oxydoréduction, les réactions générales

$$E + S \rightleftarrows ES$$

$$ES \rightleftarrows E + s + s'$$

restent valables en admettant que E est constitué ici par un système complexe (déhydrase, oxydase, accepteur, donateur et transporteur d'hydrogène) dont les réactions, en cascade, comportent des échanges d'hydrogène et d'électrons. Il est normal que dans ces conditions la pression d'hydrogène influence la vitesse de la catalyse et la dégradation du substrat.

L'intervention simultanée de l'affinité et de la vitesse de dislocation du substrat explique que la spécificité des déhydrases dépende à la fois de la structure du métabolite à oxyder et de son état énergétique. La configuration spatiale du substrat détermine sa fixation sur l'enzyme et les échanges électroniques, la différence des niveaux de potentiel satisfaisant aux exigences énergétiques. Le double jeu des facteurs d'affinité et de vitesse de dégradation permet d'expliquer également le comportement de l'estérase hépatique vis-à-vis du mandélate d'éthyle racémique d'une part et du mélange de ses isomères optiques d'autre part [457].

On ne parvient pas toujours à dissocier les deux facteurs précédents et le mode d'action des groupements actifs comme la nature de la combinaison Enzyme-Substrat est parfois difficilement accessible. Les méthodes chimiques permettent de caractériser les liaisons de valences primaires, mais elles sont souvent incapables de définir les combinaisons par valences secondaires ou par adsorption. Si l'identification des courbes d'affinité avec les isothermes d'adsorption de FREUNDLICH [190, 198, 375] illustre le caractère colloïdal des enzymes, elle ne renseigne guère sur la nature des liaisons d'adsorption. Il est également difficile de déterminer les facteurs qui influencent la vitesse de dissociation de la combinaison Enzyme-Substrat. S'il est possible dans les oxydations et réductions enzymatiques de

prévoir l'allure du phénomène et de calculer son expression énergétique [321] il n'est pas aisé dans le cas des hydrolases de préciser le mécanisme de dégradation du substrat S en s + s'.

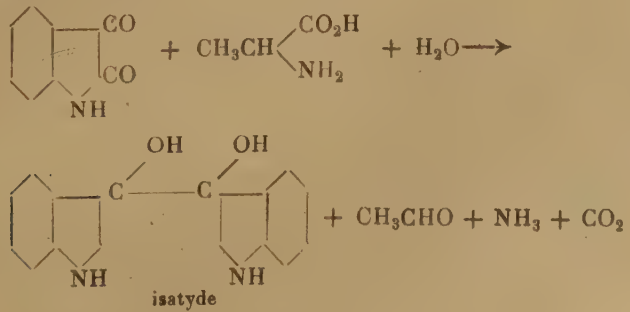
C. — Rôle des constituants de l'enzyme dans la spécificité.

Les remarques précédentes laissent prévoir qu'il n'est pas toujours possible de tirer des données relatives à la constitution du substrat des conclusions sur la nature de l'enzyme ; par ailleurs la connaissance de la structure chimique de celui-ci ne permet pas nécessairement de délimiter le rôle de l'Apo- et du Coenzyme dans la sélectivité du ferment.

1° *Constitution des enzymes.*

L'hypothèse de G. Bertrand relie l'action de la laccase à une « complémentaire active » et à une « complémentaire activante », l'une participant directement à l'oxydation, l'autre constituant le support du catalyseur métallique et exaltant l'activité de celui-ci [74]. La théorie de la double affinité de v. Euler attribuant à deux groupements voisins distincts la fixation du substrat sur l'enzyme et la dégradation du substrat, affirme davantage la différence fonctionnelle des constituants enzymatiques. Basée sur l'étude cinétique de l'affinité et de l'inhibition spécifique des groupements cétoniques, aldéhydiques, aminés de la saccharase, des peptidases (voir p. 32), elle cherche à expliquer la catalyse enzymatique et particulièrement la fixation du substrat sur l'enzyme par la mise en jeu des valences principales. La constante de Michaelis acquiert ainsi la signification d'une constante chimique ordinaire et la possibilité de fixation du substrat sur l'enzyme conditionnerait la spécificité individuelle.

Par ailleurs, les recherches de Langenbeck sur les modèles d'enzymes démontrent le rôle de la catalyse par valences principales (« Hauptvalenzkatalyse »). C'est ainsi que l'isatine déshydrogène les amino-acides de la façon suivante :



isatyde

et que la décarboxylation d'un acide α cétonique par une aldimine correspond à la réaction :

$$CH_3CO - CO_2H + CH_3CH = NH \rightleftarrows CH_3C(=NH) - CO_2H + CH_3CHO$$

$$CH_3 - C(=NH) - CO_2H \longrightarrow CO_2 + CH_3 - CH = NH$$

De même le butyrate de méthyle est hydrolysé à 70° par la naphtylamide (2) de l'acide glycolique à la suite du transport de l'alcool sur ce dernier acide, transport engendrant un nouvel ester plus facilement hydrolysable que l'ester initial. Ces catalyses sont accélérées par l'emploi de certains solvants : l'action déhydrasique des dérivés de l'isatine est considérablement renforcée par la pyridine [278], le pouvoir carboxylasique du 3-amino-α naphtoloxindol par le salicylate de méthyle [278]. Il existe ainsi entre le catalyseur et le solvant des relations étroites rappelant celles que G. Bertrand distingue entre le « complément actif » et le « complément activant ». Selon Langenbeck, le solvant basique joue vis-à-vis du catalyseur le même rôle que les protéines vis-à-vis du coferment, les groupements basiques des unes étant orientés d'une façon déterminée par rapport aux centres actifs de l'autre. La spécificité de groupe est assurée par le catalyseur ou le coferment et la spécificité individuelle, par la diversité des protéines.

On rejoint ainsi la conception moderne du rôle des constituants des enzymes.

2° *Conception classique du rôle de l'apo- et du coenzyme.*

Le terme *coferment* désigne généralement le support des groupements actifs *directement* responsables de la dégradation du substrat, qu'ils soient séparables du support colloïdal comme dans les ferments héminiques, flaviniques, pyridiniques, métalliques, etc... ou intimement liés à la molécule comme dans les protéases ou les déhydrogénases simples. La nature du coferment semble commander la spécificité de groupe. Ainsi la mésohémine renfermant 2 H de plus que la protohémine possède une forte activité peroxydasique alors que, contrairement au deuxième pigment, elle est dépourvue de toute activité catalasique [278] ; l'association à l'hémine de pyridine ou d'imidazol augmente très différemment son activité peroxydasique et catalasique ; la présence de l'acide 4 (5) phényl-imidazol-p. sulfonique n'accélère pas l'activité catalasique de l'hémine mais augmente considérablement son pouvoir peroxydasique. On pourrait également pen-

ser que les différences entre la protohémine de la catalase et la phéohémine de la cytochrome-oxydase justifient la spécificité de ces deux enzymes.

Un raisonnement par analogie laisse prévoir que des variations fines de la structure du coferment pourraient déterminer des différences dans la vitesse et la mode de dislocation du substrat, suivant une réaction déterminée, et conditionne ainsi la spécificité individuelle. En fait, celle-ci dépend essentiellement de l'apoenzyme. Le support colloïdal, doué de multiples possibilités de combinaison par valences principales (MICHAELIS, v. EULER) ou indices d'adsorption (WILLSTÄTTER), assure la fixation du substrat et la spécificité relative de l'enzyme vis-à-vis des corps possédant des structures différentes, mais un même groupement fonctionnel. Ainsi les deux facteurs de spécificité individuelle : affinité et décomposition du substrat semblent dépendre, le premier, de l'apoenzyme, le second du coenzyme.

En réalité le rôle des deux constituants de l'enzyme n'est pas aussi nettement délimité. En effet, la principale fonction de l'apoenzyme est d'exalter l'activité du coenzyme et de polariser l'action de ce dernier vis-à-vis de fonctions chimiques définies. Il existe entre les deux constituants de l'enzyme une relation essentielle à la catalyse et qui n'est pas encore expliquée. La structure des noyaux pyridiniques, thiaminés ou alloxasiniques les désignerait pour la fixation et le transport d'hydrogène, tandis que la diversité des protéines, conditionnant la fixation du susbtrat sur l'enzyme, suffirait à déterminer la spécificité individuelle très étroite des déhydrogénases de même coenzyme vis-à-vis des métabolites les plus divers (acides les plus variés, alcools, glucides, aminoacides, aminoalcools). C'est l'association des deux constituants qui confère à l'enzyme son aptitude spécifique à mobiliser les H des substrats soumis à son action. Le fait est particulièrement net dans le cas de la déshydrogénase glutamique, dont le coferment peut être constitué par la codéhydrase II (levure, animaux), la cozymase (animaux) ou un dérivé de celle-ci (végétaux), l'apoferment étant une protéine spécifique toujours identique.

La relation entre l'apoenzyme et le coenzyme est plus nette encore dans le cas des phénoloxydases où un métal, le Cuivre, exerce, grâce au support protéique, une fonction aussi différenciée que celle d'oxyder le monophénol, les polyphénols, suivant des mécanismes réactionnels complexes distincts les uns des autres.

3° *Influence probable des composants enzymatiques sur le déterminisme de la spécificité.*

Dans les exemples précédents, les propriétés des coferments : aptitude de certains cycles organiques à fixer réversiblement de l'hydrogène, oxydabilité de Fe^{++}, Cu^{++}, justifient encore leur rôle. Mais, dans un grand nombre d'enzymes, le caractère banal du groupement prosthétique ne le désigne nullement pour une fonction déterminée. Il paraît difficile d'établir une relation quelconque entre la nature des cations Cu, Mg, Mn, Co, Ni, Ca, Fe, Cd, Zn, V et la fonction de l'anhydrase carbonique, de la carboxylase, de l'énolase, de la zymohexase, des peptidases. Le caractère interchangeable de ces cations, non seulement pour un même enzyme mais pour des ferments d'activité très différente, pose un des problèmes les plus importants sur le mécanisme de la catalyse enzymatique. Dans l'hypothèse où ces cations participent directement à celle-ci et jouent véritablement le rôle de coferment, on peut penser que le seuil d'énergie nécesaire pour « activer » le substrat étant réalisé différemment par les divers apoenzymes, la dégradation elle-même s'opère suivant un mécanisme commun aux divers coferments, ce qui exclurait toute participation de ces derniers au déterminisme de la spécificité. Ou encore que les groupements métalliques ne jouent pas dans les hydrolases et la carboxylase citées, le rôle de catalyseur tenu par les groupements prosthétiques dans certaines déhydrases et les oxydases. La question serait alors de savoir si les cations divalents ne servent pas simplement à fixer le substrat sur l'enzyme, grâce à leur aptitude à former des complexes. Cette manière de voir revient à attribuer une part essentielle de la catalyse à l'apoenzyme dont certains groupements constituent les véritables centres actifs des catalyseurs. Elle semble correspondre au mode d'action d'un grand nombre d'enzymes : les protéases, les estérases, les carbohydrases, les déshydrogénases simples, qui ne renferment pas de coferments dissociables. Elle s'explique par la facilité avec laquelle les acides aminés, α cétocarboxyliques, carboniques, les esters phosphoriques, les peptides qui constituent les substrats des carboxylases, anhydrase carbonique, énolase, zymohexase, peptidases, forment des complexes avec les cations divalents.

L'analyse des possibilités réactionnelles des constituants de l'enzyme montre qu'il y a effectivement fixation du substrat sur l'enzyme soit par valences principales soit par adsorption. La dissociation du substrat s'opère en mettant en jeu des valences principales (modèles d'enzymes, déhydrases, oxydases). Mais la

participation des constituants de l'enzyme à chacune des deux réactions :

$$E + S \rightleftarrows ES$$
$$ES \rightleftarrows E + s + s'$$

reste obscure. Le rôle de l'apoenzyme dans la fixation du substrat et celui du coferment dans la dégradation de ce dernier semblent réels. Toutefois l'influence prépondérante du support colloïdal comme « complémentaire activante » et, devrait-on ajouter, comme « déterminante de la spécificité », montre que l'apoenzyme intervient directement dans la catalyse, par quelques-uns de ses centres actifs. Le fait est indéniable dans le cas des protéases, des carbohydrases, et également dans ceux des estérases, des déhydrases simples. L'apoenzyme détermine ainsi la spécificité individuelle non seulement parce qu'il sert à la fixation du substrat mais également parce qu'il détermine le mode de dislocation de ce dernier et règle la vitesse de la réaction.

En outre le caractère interchangeable des cations divalents qui entrent dans la constitution d'un grand nombre d'enzymes d'activité profondément distincte, nous conduit à attribuer à ces corps un rôle de fixation du substrat par formation des complexes. Dans cette hypothèse, le groupement prosthétique conditionne la spécificité de certains enzymes en intervenant dans la dislocation du substrat ; vis-à-vis d'autres enzymes il ne joue qu'un rôle de fixation du substrat et le déterminisme de la spécificité repose entièrement alors sur l'apoenzyme.

CONCLUSIONS.

Malgré l'imprécision qui pèse sur la part effective des deux constituants enzymatiques dans le déterminisme de la spécificité, on peut affirmer que leurs propriétés régissent les relations entre le substrat et l'enzyme. Dès lors la cinétique des réactions enzymatiques, selon les équilibres (1), (2), (3) que nous avons distingués, constitue l'expression générale des variations de la spécificité en fonction de la structure des substrats.

L'étude de ces variations de spécificité a contribué largement à la connaissance des enzymes. Elle a permis, surtout dans le domaine des hydrolases, d'établir une classification alors que la constitution chimique de ces corps ne pouvait servir de base à celle-ci. La connaissance de certains groupements actifs de l'enzyme, de l'importance et du rôle de l'apo- et du coferment découle de la même étude. La constitution de certains glucides ou de protéines, celle des haptènes [292, 449] le mode d'action des venins hémolytiques [62], l'explication moderne de certains as-

pects de la génétique [90, 91, 263] ont largement bénéficié de l'examen des variations de spécificité en fonction de la constitution des substrats. Enfin les techniques de la Chimie générale, après avoir reçu de Pasteur l'un des moyens de séparer les isomères optiques, se sont enrichies de nouvelles méthodes d'hydrogénation, d'oxydation, etc... basées sur l'activité préférentielle des microorganismes et des enzymes sur certains éléments structuraux des corps chimiques les plus divers [146].

⁂

II. — Spécificité enzymatique et pH.

La notion de pH, élaborée par Sörensen à propos des enzymes [406], et qui a permis de mettre en évidence l'amphotérie des catalyseurs biologiques fournit un autre moyen de caractériser ceux-ci. La dissociation électrolytique de l'enzyme, du substrat, du produit intermédiaire Enzyme-Substrat et d'une façon générale, en dehors de toute hypothèse sur la nature de l'enzyme, la somme des charges électriques propre à ces corps sont sous la dépendance de la concentration en ions H. L'état des équilibres :

$$\text{Apoe} + \text{Coe} \rightleftarrows \text{E} \qquad (1)$$

$$\text{E} + \text{S} \rightleftarrows \text{ES} \qquad (2)$$

$$\text{ES} \rightleftarrows \text{E} + \text{s} + \text{s'} \qquad (3)$$

doit rendre compte des variations de l'action enzymatique en fonction du pH.

A. — Le pH et la dissociation de l'enzyme.

Après que Hudson et Paine [208] eurent établi le caractère amphotère de l'invertase, Michaelis et Davidsohn [307], ont montré par des mesures de l'activité enzymatique et par la détermination des constantes de dissociation électrolytique, que l'action fermentaire doit relever de l'invertase indissociée et non de l'anion ou du cation fermentaire. L'action du pH sur l'hydrolyse enzymatique s'explique par l'influence qu'exercent les ions H^+ sur la dissociation de l'enzyme. Le pH optimum correspondant au point isoélectrique de l'ampholyte serait plus ou moins étroit selon que les pk de l'enzyme-cation et de l'enzyme-anion présentent des valeurs plus ou moins éloignées. Il serait alors l'expression d'une fonction dont les variables sont liées à la nature même de l'enzyme. Toutefois l'optimum ne coïncide pas

toujours avec le point isoélectrique de l'enzyme [307, 309, 310], car l'activité de celui-ci peut être considérée comme liée à la dissociation de quelques groupements particuliers de l'apoenzyme, dont certaines fonctions servent à la fixation du coferment, et d'autres, à celles du substrat. La stabilité de l'holoenzyme et son état réactionnel dépendent ainsi du pH, surtout lorsque le coenzyme lui-même présente un certain degré de dissociation ou un changement de valence du cation actif ($Fe_{II} \longrightarrow Fe_{III}$ p. ex.). Le décalage important du pH optimum de l'activité peroxydasique de la protohémine (5,0) et de la mésohémine (6,5) laquelle renferme deux H de plus que la première pourrait s'expliquer de cette façon.

L'étude cinétique de l'activité enzymatique en fonction du pH permet ainsi de caractériser la spécificité du catalyseur biologique, d'une part d'après le degré de dissociation électrolytique de ses groupements actifs et, d'autre part, d'après la stabilité de l'holoferment.

B. — Le pH et la dissociation élctrolytique du substrat.

La courbe d'activité en fonction du pH renseigne sur l'état que doit présenter le substrat pour subir l'action du catalyseur. Etudiant l'activité de la pepsine et de la trypsine sur la caséine, l'édestine, la gélatine, l'hémoglobine et la globine, Northrop a établi que la pepsine n'agit que sur la protéine-cation et la trypsine, sur la protéine-anion [333]. De leur côté les protéases végétales présentent un pH optimum au voisinage du point isoélectrique de leur substrat. La papaïne digère la fibrine (pH du point isoélectrique = 7.2) à pH = 7,2 et la gélatine (pH du point isoélectrique = 4,8) à pH = 5,5 [168, 455].

Les relations entre le pH optimum et les caractères électrochimiques des substrats se retrouvent avec d'autres composés chimiques, en particulier avec les esters [15]. Le pH optimum traduit ainsi dans certains cas, le degré de dissociation électrolytique que doit présenter le substrat afin que l'action catalytique puisse s'exercer.

C. — Le pH et la combinaison Enzyme-Substrat.

L'action du pH ne consiste pas seulement à mettre l'enzyme et le substrat dans un certain état de réactivité ; elle règle également leur combinaison. La concentration en ions H^+ peut en effet modifier d'une part l'affinité de l'enzyme pour le substrat et, d'autre part, la vitesse de décomposition du produit intermédiaire Enzyme-Substrat.

Ainsi *l'affinité* de la saccharase de levure pour le saccharose croît régulièrement de pH = 2,6 à 4,5, tandis que celle de la β glucosidase de l'émulsine pour le salicoside présente une valeur maxima à pH = 4,4 et des valeurs plus faibles aux pH = 2,8 et 6,5 [223, 224]. Des variations analogues d'affinité en fonction du pH ont été également observées avec l'estérase hépatique [38] ou calculées pour la laccase, l'uréase [104].

Quant à la *décomposition du produit intermédiaire Enzyme-Substrat,* elle peut être soumise à la catalyse directe par les ions H^+ et OH^-. Selon HALDANE, l'enzyme ne confère pas au substrat un état d'instabilité particulière, mais exalte sa sensibilité aux ions H^+ [183].

D. — FACTEURS MODIFIANT LE pH OPTIMUM.

Le pH optimum, critère de spécificité des actions enzymatiques, peut être altéré par un certain nombre de facteurs agissant sur l'enzyme. Par exemple l'abaissement du pH optimum de la saccharase de levure à la suite d'une élévation de température [322] est vraisemblablement lié à des modifications de l'apoenzyme protéique. L'influence des solutions tampons sur le pH optimum de la lipase pancréatique (6,9 en milieu phosphaté et de 8,5 en solution boratée [352]) est souvent liée à des effets activateurs et inhibiteurs. Ainsi l'oxalate de calcium, les sels biliaires, l'albumine activent la lipase pancréatique en milieu alcalin et l'inhibent en milieu acide [460]. Les activateurs et les inhibiteurs naturels présentent des variations analogues en fonction du pH ; ceci explique que le pH optimum de la lipase gastrique non purifiée soit aussi bas [457]. Le pH optimum de la glucosulfatase passe de 7 à 5 après la purification de cet enzyme [154]. L'action des produits naturels porte sur le support colloïdal, l'ionisation des groupements actifs ou les charges électriques des micelles. Des variations importantes du pH optimum peuvent être ainsi déterminées par l'apport de ce que WILLSTÄTTER appelle « ballast » ou « Begleitstoffe » ou par leur émigration au cours des opérations de purification, ou par l'action protéolytique, comme dans le cas des spermato- et blasto-lipases. En définitive les variations du pH optimum s'expliquent par l'influence de la concentration en ions H^+ sur les réactions des effecteurs avec l'enzyme [334, 434].

CONCLUSIONS.

Dans une large mesure, correspondant à une signification plus biologique que chimique, le pH optimum peut caractériser un

enzyme à l'état naturel, c'est-à-dire entouré de son « cortège » physiologique d'activateurs et d'inhibiteurs. La lipase gastrique, les blasto- et spermatolipases sont les exemples de ces systèmes enzymatiques naturels dont le pH optimum traduit non seulement la stabilité de l'enzyme, mais également les conditions d'activation maxima et d'inhibition minima.

Dans des préparations suffisamment purifiées le pH optimum définit véritablement la somme des charges électriques du catalyseur biologique. Par sa triple action sur l'état du substrat, des complexes Apoenzyme-Coenzyme, et Enzyme-Substrat, il constitue un excellent critère de spécificité enzymatique. Pour cette raison, les variations du pH optimum peuvent fournir de précieux renseignements au cours de l'isolement et de la purification des enzymes ; la constante de ce facteur constitue un véritable critère de pureté.

Enfin à certaines concentrations les ions H^+ dissocient l'enzyme en ses constituants que l'on peut alors isoler. C'est ainsi que la dialyse en milieu acide a permis à Theorell de séparer la flavine de la protéine à laquelle elle est attachée [421]. Les succès des méthodes d'adsorption et de chromatographie ne peuvent être assurés qu'en tenant compte de l'influence du pH sur les conditions d'adsorption et d'élution et sur la stabilité de l'enzyme, la première s'expliquant par le rôle de la concentration en ions H^+ sur le pouvoir de combinaison, avec l'adsorbant, des divers enzymes, des constituants de ces derniers, des effecteurs naturels, et cela selon un mécanisme analogue à celui qui régit les équilibres (1), (2), (3).

⁂

III. — Spécificité enzymatique à l'égard des effecteurs.

Comme la comparaison des structures fines du substrat et l'étude de l'activité enzymatique en fonction du pH, l'explication des phénomènes d'activation et d'inhibition fait intervenir dans la catalyse biologique la suite des réactions d'équilibre :

$$\text{Apoe} + \text{Coe} \rightleftarrows \text{E} \quad (1)$$

dont la constante K_1 définit l'affinité de Apoe pour Coe

$$\text{E} + \text{S} \rightleftarrows \text{ES} \quad (2)$$

dont la constante K_2 définit l'affinité de E pour S

$$\text{ES} \rightleftarrows \text{E} + \text{S} + \text{s'}$$

dont la constante K_3 définit l'affinité de E pour S et s'.

Le déplacement de l'équilibre vers la droite est favorisé par les activateurs ; il est empêché ou gêné par les inhibiteurs. La réversibilité de ces phénomènes suppose l'existence, entre l'effecteur et les divers constituants des réactions précédentes, des constantes d'équilibres analogues à la constante d'affinité de MICHAELIS.

$$k_1 = \frac{[\text{Apo}]\,[\text{effecteur}]}{[\text{Apo-effecteur}]} \qquad k'_1 = \frac{[\text{Coe}]\,[\text{effecteur}]}{[\text{Coe-effecteur}]}$$

$$k_2 = \frac{[\text{E}]\,[\text{effecteur}]}{[\text{E-effecteur}]}$$

$$k_3 = \frac{[\text{ES}]\,[\text{effecteur}]}{[\text{ES-effecteur}]}$$

Les rapports des affinités k_1, k'_1, k_2, k_3 et K_1, K_2, K_3 conditionnent les limites de la réversibilité et les concentrations en effecteurs, en constituants de l'enzyme Apo et Coe, en enzyme E, en combinaison Enzyme-substrat ES, l'importance des phénomènes de concurrence observés. L'effet combiné des rapports d'affinité et des concentrations en constituants des réactions joue un rôle important dans l'action activatrice ou inhibitrice d'un corps. Ceci exige l'emploi pour l'étude de la spécificité d'une part des préparations enzymatiques suffisamment purifiées, exemptes d'effecteurs naturels et d'autre part, d'échelles étendues de concentrations en effecteurs.

A. — Lyo et desmo-enzymes.

L'état de l'enzyme conditionne son degré d'activabilité. La distinction entre lyo- et desmo-enzymes repose initialement sur la plus grande solubilité des premiers, et par voie de conséquence, sur leur très grande sensibilité à l'égard des réactifs. Les desmoformes, grâce au « cortège des colloïdes » qui entourent le symplexe enzymatique sont moins accessibles à l'étreinte des agents chimiques que les lyoformes, dépourvus des « ballastes » protéiques et plus exposés à subir l'influence des substances étrangères.

La notion de lyo et desmo enzyme, conçue par WILLSTÄTTER et BAMANN fournit des renseignements précieux sur la liaison de l'enzyme aux constituants tissulaires et met en relief l'influence importante des colloïdes qui l'accompagnent [46, 458]. BAMANN a récemment développé cette conception en attribuant des différences de constitution aux lyo et desmo-formes [46]. En basant exclusivement sur les combinaisons aux protéines la diversité

des caractères des lyo- et desmo-enzymes, cette théorie semble perdre de vue le rôle joué par les ions inclus non seulement dans les « ballastes » protéiques mais aussi *fixés à l'apoenzyme lui-même. Le degré de saturation de ce dernier en électrolytes,* dont les uns jouent concurremment avec les coenzymes un rôle activateur, et les autres un rôle inhibiteur, dépend des méthodes d'extraction, *au même titre que la richesse des préparations enzymatiques en protéines.* Le choix des solvants et des temps d'extraction, en vue d'éliminer les colloïdes étrangers à l'enzyme ou d'éviter leur passage en solution n'est pas sans influencer la solubilisation des minéraux présents. L'emploi du glycérol ou d'ammoniaque diluée, de préférence à l'eau ou aux acides dilués, restreint la mise en solution des grosses protéines et limite en même temps celle des métaux. La brièveté des temps d'extraction gêne l'extraction des minéraux et la formation souvent lente, des complexes protéines-métaux, en éliminant l'autolyse et la solubilisation des colloïdes cellulaires inactifs.

La notion de lyo- et desmo-enzyme, basée sur le choix des solvants et des temps d'extraction, doit tenir compte de la présence à l'état naturel, non seulement des colloïdes, mais également des ions. Si les premiers sont susceptibles d'altérer la spécificité de l'enzyme, les seconds, fixés sur l'apoenzyme, *parfois au même titre que les groupements actifs,* sont capables de modifier profondément les caractères du catalyseur. Le zinc, qui joue auprès de l'énolase le même rôle que le magnésium, sature l'apoenzyme à des concentrations plus faibles que ce dernier, grâce à sa très forte affinité pour les protéines (voir p. 35). L'effet d'un apport supplémentaire d'ions Mg^{++} à un tel enzyme rapidement saturé en zinc est faible, et si l'on se bornait à cette activation, on n'attribuerait à ce métal qu'un rôle activateur médiocre [**443**].

La présence à l'état naturel des cations éprouvant des affinités inégales pour les constituants organiques, en particulier pour l'apoenzyme, permet de considérer comme aussi importante que la notion de lyo- et desmo-enzyme, et par ailleurs comme complémentaire de celle-ci, celle de degré de saturation des apoenzymes en ions actifs [**423**].

B. — Inhibiteurs.

L'inhibition peut d'abord porter sur l'équilibre (1), elle consiste alors à s'opposer à la formation de l'holoenzyme E, forme active du ferment. Il résulte des expériences de Kraut et Pantschenko-Jurewicq [**256**], des observations de v. Euler [**134**]

que la concentration de la forme active de l'enzyme, régie par l'équation de masse

$$\frac{[\text{Apoe}]\ [\text{Coe}]}{[\text{E}]} = K_i$$

diminue par l'élimination soit de l'Apoenzyme soit du coenzyme, un excès de ces deux corps assurant la stabilité et l'intégralité du catalyseur biologique contre l'action de la dilution et l'inhibition concurrente.

L'inactivation des solutions enzymatiques à la suite des dilutions ou du vieillissement est due à cette dissociation de l'enzyme en ses constituants. L'irréversibilité du phénomène peut survenir à la suite des transformations du coenzyme et de l'apoenzyme libérés [256].

La protéine enzymatique s'inactive à la suite non seulement des phénomènes de dénaturation, mais aussi, on le conçoit aisément, de remaniements de structure. L'élimination des coferments, en particulier des groupements métalliques, peut libérer certains H dont la migration d'un —NH sur un —CO engendrerait des cycles (D. Wrinch) et créerait des possibilités nouvelles de combinaison qui ne sont pas forcément compatibles avec la reconstitution de l'holoenzyme. Les remaniements des chaînes polypeptidiques avec redistribution d'électrons, apparition de nouvelles attractions électrostatiques, d'une solvatation différente des chaînes latérales, de la création de nouveaux centres d'attraction pour les ions, expliquent les possibilités d'inactivation de l'enzyme après la séparation des coferments au cours de la dilution ou de la purification. Un tel phénomène doit sans doute être invoqué pour expliquer que l'inhibition complète de la zymohexase de levure par le pyrophosphate ne soit pas réversible lors de l'addition de coferments métalliques [443].

L'inactivation est due encore à la diminution d'affinité entre les constituants de l'enzyme. Il n'y a pas élimination de l'un ou l'autre de ceux-ci de leurs points de fixation respectifs par l'effecteur. Mais il s'établit entre l'apoenzyme, le coenzyme et l'inhibiteur un équilibre semblable à celui qui se produit s'il y a concurrence à un même point d'affinité [135]. Ceci explique que la succinodéhydrase qui est indépendante de la cozymase est inhibée par ce corps tout comme les déhydrases à pigments pyridiniques. L'inhibition non spécifique de la déshydrogénation par des corps parfaitement différents de la cozymase, tels que les acides carbocycliques et hétérocycliques, proviennent du même fait.

La diminution d'affinité s'observe directement dans les inhi-

bitions concurrentes aux dépens du coenzyme ou de l'apoenzyme. Des exemples de concurrence du premier type sont fournis par les métaux lourds qui se fixent sur le support colloïdal à la place des groupements actifs métalliques. Ce mécanisme d'inactivation a servi récemment à R. Kuhn pour expliquer d'une part l'antagonisme nuisible à la croissance des microorganismes, entre l'acide sulfopantothénique et l'acide pantothénique, et d'autre part l'action antiinfectieuse des sulfamides dont la concurrence est flagrante avec la vitamine H' (acide p. aminobenzoïque) [264]. L'influence de ce dernier sur la couleur du pelage des animaux peut être empêchée de la même façon par le salicylate de Na dont la concurrence s'efface devant des concentrations croissantes d'acide p. aminobenzoïque. La robe rouge que prennent les Rats noirs après administration du salicylate disparaît par injection simultanée du facteur chromotrichique [135]. La mise en évidence de ces phénomènes de concurrence, dus sans doute à des déplacements d'adsorption sur un même support protéique et qui évoquent fidèlement les déplacements des équilibres enzymatiques, constitue sans doute l'une des plus précieuses acquisitions de la Biologie moderne. Comme l'a souligné R. Kuhn, elle pourrait servir de principe général de recherches en chimiothérapie ; « celle-ci se libérerait ainsi des langes de l'empirisme » et « la découverte des substances antiinfectieuses ne serait plus, comme l'a soutenu Ehrlich, le fait du hasard ». Ces phénomènes permettent sans doute de comprendre l'action des antivitamines, en particulier des antivitamines K dont l'efficacité a été rapportée à une sorte de « doublement moléculaire » [305, 306]. Ils expliqueraient également la propriété de certains carbures dépourvus d'activité cancérigène mais de constitution analogue à celle de ces substances d'altérer la virulence de ces dernières [275].

L'apoferment de son côté peut être supplanté par d'autres colloïdes qui captent à ses dépens les groupements actifs. C'est ainsi qu'agissent de nombreuses impuretés de nature colloïdale qui accompagnent les préparations enzymatiques brutes. Dans le même ordre d'idées, l'avidalbumine du blanc d'œuf, supplantant les protéines spécifiques normales, fixe la biotine et provoque chez les Rats, élevés avec des régimes trop riches en certaines protéines, des maladies de carence apparente [122, 123, 180, 181, 345, 430].

Grâce à ces phénomènes de concurrence, l'emploi judicieux des formateurs de complexes permet la mise en évidence des coferments métalliques. En principe l'inhibition d'un enzyme par des formateurs de complexes et sa réactivation par des cations

constituent les preuves d'existence des coferments métalliques (Warburg et Sakuma). Ainsi le pyrophosphate, la cystéine, le glutathion réduit qui s'unissent facilement aux cations libres ont permis de mettre en évidence la présence de Cu dans l'oxydase de pomme de terre [203, 259, 409] de Zn, Fe, Mg dans la zymohexase [443], de Mg, Mn, Zn dans les peptidases [69]. Le diéthyldithiocarbamate détache de la même façon Zn de l'arginase [83], et l'αα'-dipyridyl, les métaux constituant le coferment de la zymohexase de levure [443]. Lorsque le coferment métallique est inclus dans un complexe indissociable, l'effecteur inhibe en se fixant sur le métal qui n'est plus en mesure de jouer son rôle dans la catalyse enzymatique. C'est ainsi que CN et CO bloquent le fer du ferment respiratoire de Warburg [440]. L'inhibition de l'énolase par le fluorure, en présence de phosphate, repose sur la formation d'un complexe inactif selon la réaction

Mg-Fluophosphate + Mg enolase $\rightleftharpoons$ Mg Fluophosphaténolase + Mg [442].

Inversement des groupements thiols de l'enzyme, donnant lieu à la formation des mercaptals ou des mercaptides peuvent être bloqués par des métaux lourds. C'est vraisemblablement grâce à un tel mécanisme que l'uréase est inhibée par Cu [195]. Les cations peuvent d'ailleurs bloquer d'autres fonctions organiques de l'enzyme. Selon Myrbäck [318]. Ag, Cu, Pb, Zn, Cd, inhibent la saccharase par formation avec les fonctions acides de l'enzyme des sels peu dissociables ; Hg^{++} inactive au contraire le même enzyme en se combinant à des radicaux aminés. Les groupements aminés ou carbonyles peuvent être d'ailleurs détruits par l'emploi des réactifs spécifiques. C'est ainsi que la saccharase peut être inhibée aussi bien par les réactifs d'aldéhydes : l'aniline et ses dérivés, la phénylhydrazine, l'aminoguanidine etc... que par ceux des amines : aldéhyde, NO_2H, acides picrique, phosphotungstique, silicotungstique etc... De même l'action inhibitrice des groupements méthyl, éthyl, acétyl s'expliquent par le blocage des restes osidiques de la β glucosidase de l'émulsine [192]. L'eau oxygénée, l'alloxane, le méthylglyoxal, les déhydrogénases, en oxydant le groupement SH de la papaïne, la font passer de la forme active PaSH à la forme inactive Pa-SS-PA [166, 167]. Inversement l'acide ascorbique inhibe la catalase par réduction de son groupement héminique [136].

Il y a également inhibition concurrente lorsque la concentration du complexe Enzyme-Substrat, régie par l'équilibre $\frac{[E]\,[S]}{[E\,S]} = k_2$ diminue par fixation des inhibiteurs spécifiques sur l'enzyme à la place du substrat. L'inactivation spécifique

par les produits de l'hydrolyse, observée pour la première fois par Amstrong [18], se traduit par une baisse d'affinité de l'enzyme pour le substrat. La lactase est ainsi inhibée par le galactose [18], l'émulsine par le glucose, le galactose, le fructose [18], la saccharase par les deux constituants du sucre de canne [308]. Il est vrai cependant que des sucres inhibent la saccharase qui n'offrent pour celle-ci aucune affinité [261]. La fixation du substrat sur l'enzyme peut être concurrencée également par des corps offrant avec les produits d'hydrolyse des analogies de structure. Tel est le cas de l'inhibition de la glucosulfatase par le maltose, le cellobiose [154], de celle des dipeptidases par les acides aminés [47], de celle de la cholinestérase non seulement par la bromocholine, l'acétylcholine, la bromoéthoxycholine, mais également par les matières colorantes basiques, les bases quaternaires d'ammonium très dissociées [186], de celle des déhydrases des acides en C_4-dicarboxyliques par le malonate d'éthyle [153, 175]. L'arrêt des réactions antigènes-anticorps par les haptènes correspondants relève sans doute du même mécanisme [292, 449].

La concentration en combinaison Enzyme-Substrat peut diminuer également par adsorption d'une certaine proportion de l'enzyme libre sur des alcaloïdes adsorbants [376, 377]. Dans ce dernier cas, l'inhibition ne survient que lorsque l'enzyme se fixe sur l'adsorbant par les groupements actifs comme la lipase sur le cholestérol, la pepsine sur le fer colloïdal et non lorsque le catalyseur adhère à la surface de l'adsorbant par le support colloïdal comme la saccharase au kaolin [339]. De même l'inhibition de l'estérase hépatique par les acides biliaires [35, 255] le méthyl n-hexylcarbinol, le méthyl β phényléthylcarbinol [317], celle des déhydrases par les alcools supérieurs et l'uréthane [439], celle de la saccharase par Ca^{++} et Mg^{++} en présence d'albumine et de gélatine peuvent être interprétées comme un abaissement du pouvoir adsorbant de l'enzyme, à la suite d'une diminution des surfaces actives du colloïde. La combinaison ES peut encore se former d'une façon imparfaite, non adaptée à l'action catalytique. L'action inhibitrice de fortes concentrations en substrats a été ainsi considérée, dans le cas des lipases, comme le résultat d'un encombrement apporté par l'excès des lipides à leur fixation sur l'enzyme : l'ester au lieu d'être fixé à la fois par le reste acide et le reste alcoolique ne l'est plus qu'en un seul point et reste inattaqué [183].

Le complexe enzyme-substrat une fois formé, l'inhibition peut encore porter sur la troisième réaction d'équilibre ; elle consiste alors à empêcher la dislocation du produit intermédiaire. L'empêchement de l'hydrolyse du butyrate de méthyle par des lac-

tones telles que celles des acides γ oxybutyrique, γ oxyvalérianique, la coumarine, la santonine [48, 49], celui de l'hydrolyse du mandélate d'éthyle par l'ester droit et l'alcool libéré ont été interprétés [34, 35] comme les conséquences de la formation d'un complexe enzyme-substrat-inactivateur, non ou peu dissociable [33].

Dans la formation de tels complexes comme dans la fixation de l'enzyme sur des adsorbants inertes ou comme dans l'action concurrente de divers corps avec le substrat, le coenzyme et l'apoenzyme, la réversibilité de l'inactivation dépend directement des rapports d'affinité que présentent les inhibiteurs pour le complexe enzyme-substrat, l'adsorbant, l'enzyme et ses constituants. La concentration en substrat, en ferments, en apo- et coenzyme, limite la concurrence et l'inhibition ; la protection est d'autant plus efficace qu'il y a plus d'affinité entre les constituants de l'enzyme, celui-ci et le substrat. Dans le même ordre d'idées, la posologie des sulfamides serait plus simple si ces corps présentaient pour les récepteurs spécifiques des microorganismes des affinités plus fortes que celles de la vitamine H' [264].

L'intérêt des réactions d'inhibition est qu'elles permettent de transposer à l'enzyme les propriétés connues des minéraux et des fonctions organiques au même titre que l'étude de la structure des substrats. Celles qui sont basées sur les phénomènes de concurrence avec les constituants de l'enzyme ou le blocage des groupements actifs de ces derniers sont évidemment les mêmes adoptées à l'étude des structures des enzymes. Mais, comme les autres formes d'inactivation enzymatique, elles reposent essentiellement sur un arrêt des équilibres enzymatiques inscrits ci-dessus.

C. — Activateurs.

Ceux-ci, comme les inhibiteurs, peuvent agir aux trois stades de la réaction enzymatique.

Une première forme d'activation consiste à faire passer l'enzyme à un état de réactivité correspondant au pouvoir catalytique maximum de tous les groupements actifs. Elle a parfois pour effet de faire cesser l'état naturel d'inactivité de ceux-ci. C'est alors un véritable phénomène d'induction, matérialisé par un temps d'incubation plus ou moins long de l'enzyme avec les activateurs, pour atteindre l'activation. Il diffère de l'anti-inhibition (p. 39) car il porte directement sur l'enzyme, et non, comme dans ce dernier cas, sur les impuretés inactivatrices. C'est ainsi que la papaïne oxydée inactive, Pa-SS-Pa, est réduite

à l'état de PaSH actif par CNH, les sulfures, les thiols [155, 167, 303]. La cathepsine est activée d'une manière analogue par les mêmes corps [300], lesquels comme les protéines du cristallin de l'œil de Bœuf [366] accélèrent par le même mécanisme l'action digestive de diverses protéases : benzamidase, protéase de la levure, celle du blé, lysozyme etc... [303, 438]. Le développement des groupements actifs explique sans doute que l'activation soit parfois accompagnée d'une extension du domaine de la spécificité. C'est ainsi que la papaïne —CNK hydrolyse non seulement les protéines végétales mais également les peptones qui sont inattaquées par la papaïne seule [454]. L'action des couples acide ascorbique-Fe_{II}, acide pyruvique-Fe_{II}, acide succinique-Fe_{II} aboutit au même résultat [295, 358]. Ces corps agissant probablement par l'intermédiaire des groupements SH semblent conférer à la protéase végétale l'aptitude à se fixer sur certaines protéines de faible poids moléculaire non hydrolysables par la papaïne naturelle. Inversement l'enterokinase semble permettre à la trypsine d'attaquer les protéines naturelles et les peptones tandis que sa présence n'est pas indispensable à l'hydrolyse des polypeptides [434].

L'activation peut aussi consister à favoriser la combinaison Apo + Coe $\rightleftarrows$ E, c'est-à-dire la formation de l'holoenzyme en complètant les groupements actifs de l'apoenzyme, présents en quantité insuffisante dans les milieux naturels. C'est ainsi que Mg^{++}, partie intégrante de la carboxylase avec l'aneurinediphosphate [286] peut coexister dans une certaine mesure avec les ions divalents Mn, Fe, Co, Ni [252] de l'enzyme. L'activation de l'arginase par les mêmes cations ainsi que par Zn, Cd semble être due également au rôle de compléments que jouent ces électrolytes vis-à-vis de Mn, considéré comme constituant de l'enzyme [346]. L'existence des groupements métalliques complémentaires pourrait s'expliquer par les possibilités de combinaison (formation de complexes) différentes d'un cation à un autre.

Les affinités qui régissent la formation des complexes protéines-métaux et les propriétés catalytiques vraisemblablement différentes des cations imposent des limites à l'interchangeabilité des métaux fonctionnant comme groupements actifs. Un cation activateur doué d'une forte affinité pour les supports colloïdaux (1) et faible pour les substrats (ou d'un pouvoir catalyseur faible) peut à des concentrations croissantes, « évincer »

(1) Il faut noter à ce propos que de tous les métaux essayés, Zn paraît être celui qui possède la plus forte affinité pour les protéines et qui forme avec celles-ci les complexes les mieux connus. Il est remarquable que pour le même effet produit, Zn agit toujours à plus faible concentration que les autres métaux [252. 443, 290, 294].

l'ion actif propre à l'enzyme et déterminer une inhibition. Ces inversions du caractère « modificateur » des ions que traduisent les optima des courbes d'activation en fonction des concentrations en activateurs, ne devraient, en principe, s'observer que sur les ions « secondaires » et non sur ceux qui font partie de l'enzyme même. Ainsi elles caractérisent l'action de Fe, Co, Ca, Ni sur la carboxylase tandis qu'elles ne se produisent pas avec Mg^{++}, constituant de l'enzyme [252]. Ces faits ne peuvent cependant constituer un critère d'analyse pour la détermination des groupements actifs de l'enzyme, car les protéines, peuvent être inactivées à des concentrations moyennes en cations. Ainsi l'apoenzyme de l'énolase est déjà inhibé par son coferment Mg^{++} à des concentrations supérieures à 1.10^{-2} m/l ; et il est inhibé par Mn^{++} et Zn^{++} qui jouent le même rôle que le premier ion, à des concentrations plus faibles encore (1.10^{-3}) [443]. Les différences d'affinité ou de pouvoir catalytique expliquent sans doute également les exemples de spécificité très étroite des cations chez certains enzymes. Ainsi Co^{++} qui active fortement l'hydrolyse de la glycylglycine inhibe celle de la glycylleucine et de la glycylalanine ; au contraire Zn qui inhibe constamment le dédoublement de la glycylglycine active celui de la glycylleucine et de la glycylalanine [294, 304]. Et tandis que l'hydrolyse de la l-leucylglycine n'est pas influencée par Mn^{++}, celle de l'isomère est activée par le même cation dans la proportion de 200 à 1000 p. 100 [47]. La spécificité varie d'ailleurs avec l'origine des enzymes. Ainsi les préparations des œufs de *Tubifex* sont activées par Mg vis-à-vis de la leucylglycine et non de la leucylglycylglycine et le phénomène inverse se produit avec *clostridium hystoliticum* [64, 65, 294]. Avec des préparations d'intestin de Rat, Mn^{++} active l'hydrolyse de la leucylglycine mais inhibe celle de la glycylglycylglycine. Ce caractère de stricte spécificité peut tenir au rôle d'intermédiaire que joueraient les cations entre l'enzyme et le substrat, les dipeptides donnant facilement des complexes métalliques [290]. Il peut être également rapporté à la nature de l'enzyme. Les variations « d'activabilité » des enzymes de différents organes [294] témoignent du fait que la structure des supports colloïdaux dont dépendent les caractères d'affinité et d'orientation favorable des groupements actifs, intervient d'une façon décisive dans le pouvoir catalytique du système. On pourrait d'ailleurs supposer que les métabolites, tels que les acides aminés, qui accompagnent un grand nombre de préparations enzymatiques, sont susceptibles de modifier, par une redistribution de charges électriques ou un regroupement de centres actifs, la nature des complexes protéines-métaux actifs et déterminer de fines

variations de spécificité. Ainsi s'expliquerait-on que certains caractères de spécificité disparaissent après purification. Des extraits bruts de carcinome de Rats sont activés par Mn^{++} dans leur activité vis-à-vis de la leucylglycylglycine et inhibés par le même cation dans les hydrolyses de la glycylglycylglycine et de l'alanylglycylglycine ; au contraire les produits obtenus par précipitation acétonique sont activés à des degrés divers par Mn^{++} vis-à-vis de tous les substrats [65].

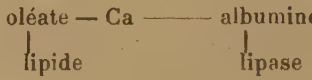
Comme la réactivation par un coenzyme est d'autant plus démonstrative que la séparation des constituants de l'enzyme a été meilleure, l'action d'un activateur est d'autant plus nette qu'elle est précédée d'une purification plus poussée. Il en résulte que le caractère activateur d'un corps déterminé est souvent provisoire. Au cours de la purification et de l'isolement, l'activateur s'avère comme tel on tend à mériter le nom de groupement actif. La « coréductase » baptisée activateur [139] a été identifiée quelques années plus tard à la codéhydrase grâce à la découverte de Warburg et Christian [441]. Il en est ainsi de l'aneurine diphosphate, du Mg, pour la carboxylase, du même métal pour l'énolase, du Mn pour l'arginase ; il en serait peut être ainsi d'autres cations pour les peptidases, les phosphatases. C'est lorsque des coferments sont recherchés comme tels, à cause des caractéristiques spécifiques (bandes d'adsorption des hémines, couleurs caractéristiques des flavines, bandes d'adsorption et fluorescence des nucléotides pyridiniques) que l'activation ou la réactivation constitue essentiellement une méthode de synthèse ou de réactivation ; dans d'autres cas, particulièrement dans celui des cations, elle constitue un moyen analytique au même titre que l'inhibition, avec cette circonstance que les réactifs employés se révèlent parfois comme les constituants du système examiné.

D. — Coactivateurs.

Si la purification réalise une condition favorable à l'essai d'un activateur, elle peut toutefois atténuer les effets de ce dernier, à la suite de l'élimination des coactivateurs naturels. Ceux-ci, doués ou non d'une action efficace propre, possèdent la propriété soit d'exalter le pouvoir activateur d'autres corps, en général des cations, soit de le faire apparaître en présence de ceux qui ne peuvent à eux seuls, exercer leur action sur l'enzyme. La coactivation réside dans une action synergique dont l'effet dépasse la somme des modifications que peut produire séparément chacun des composants du système activateur ; elle provient sans doute du fait que l'un des corps permet à l'autre d'exercer son

pouvoir activateur en favorisant sa fixation sur l'enzyme dans certaines positions « privilégiées ».

Elle exclut ainsi les activations simplement additives où chaque corps agit indépendamment sur l'enzyme. L'association de l'acide oléique et de Ca ne produit par exemple qu'un effet additif sur la lipase pancréatique ; de même celle de l'albumine et de l'oléate de Ca. Cette dernière résulte, selon WILLSTÄTTER [460] d'un renforcement des liens d'adsorption plus marqué dans le complexe.



que dans celui

Un exemple de coactivation particulier est offert par les couples d'oxydoréduction. Dans les systèmes Fe$_{II}$-acide succinique, Fe$_{II}$-substance X de la papaïne, Fe$_{II}$-acide pyruvique, Fe$_{II}$-acide ascorbique, agissant probablement par l'intermédiaire des groupements SH, on peut considérer les constituants non ferreux comme les coactivateurs du métal [70, 225, 295, 296].

La cystéine, l'acide thioglycolique et dans une certaine mesure le glutathion réduit GSH apparaissent comme de véritables coactivateurs de Fe^{++}, Mn^{++} vis-à-vis des peptidases [294]. Il ne semble pas que le rôle de ces corps puisse être rattaché à une simple réduction du déhydroapoenzyme en apoenzyme, seul capable de fixer l'ion métallique ; en effet des réducteurs aussi énergiques que l'acide ascorbique et le sulfure restent alors sans effet [294]. Il faut souligner, que les acides aminés, les peptides qui donnent facilement des complexes fonctionnent souvent comme coactivateurs. C'est ce qu'exprime BAMANN par la phrase suivante : « Vraisemblablement l'activation naturelle se produit par l'action combinée des traces d'éléments déterminés avec des acides aminés » [47]. Pour WARBURG et CHRISTIAN, la cystéine active la zymohexase parce qu'elle régularise la concentration des cations présents à la façon d'un tampon vis-à-vis des ions H^+. Grâce à son rôle de formateur de complexes, elle évite les excédents des métaux qui peuvent inhiber l'enzyme et maintient une concentration optima de ceux-ci nécessaire à l'action enzymatique [443].

La coactivation permet d'expliquer certaines variations de spécificité : Les solutions tryptasiques inactives sur la *dl* leucylglycine deviennent actives en présence d'acides aminés associés au glycérol ou à certains sucres [1].

Ainsi certaines variations d'activité et de spécificité enzymatique sont liées à la présence de coactivateurs dont un grand nombre prennent naissance au cours de l'autolyse et l'élimination de ces corps, au cours des purifications, peut modifier dans une large mesure le caractère d'activabilité des préparations [2, 149].

E. — Désactivateurs-Désinhibiteurs.

L'emploi des préparations enzymatiques purifiées, exemptes d'effecteurs permet de toute façon, d'éliminer des actions secondaires simulant des phénomènes d'inhibition ou d'activation. C'est ainsi que maints réactifs diminuent l'activité enzymatique non en lésant l'intégrité du catalyseur, mais en paralysant les activateurs présents. Les désactivateurs agissent à l'égard de ces derniers comme les inhibiteurs vis-à-vis des groupements actifs et selon le même mécanisme : concurrence entre des cations activateurs d'efficacité inégale, fixation de ceux-ci, au dépens de l'apoenzyme, sur des colloïdes naturels, blocage des cations activateurs par des formateurs de complexes etc... [38, 459].

La désactivation rappelle un phénomène inverse qui, dans les préparations brutes, simule la réaction d'activation, phénomène auquel on donne le nom de désinhibition et qui consiste en l'élimination des inhibiteurs. L'action apparemment activatrice de CNK, des thiols, de SH_2, du pyrophosphate, du citrate, de la 8. oxyquinoléine sur la papaïne [258], sur de l'uréase [194], se réduit en définitive à entraîner dans des complexes inactifs les métaux lourds inclus dans les substrats et qui inhibent l'enzyme. L'action des thiols sur l'enzyme flavinique inhibé par l'argent [266] ou celle de l'uréthane sur l'uréase inhibée par les organes métalliques sont dues à la formation de mercaptals ou de mercaptides [66, 73, 138, 165, 195, 258, 318]. A cet égard, Michaelis a souligné l'importance de l'antagonisme non seulement entre les métaux et les formateurs de complexes, mais également entre deux métaux ou même entre deux états valentiels d'un même métal [311]. Inversement les cations peuvent protéger un enzyme contre l'action des anions : c'est ainsi que l'arginase est soustraite à l'inactivation par l'acide chlorhydrique [126, 127].

La désinhibition s'exerce encore en s'opposant à la destruction ou au blocage des groupements actifs. L'oxydation par OsO_4 de l'émulsine est empêchée par l'acide ascorbique [193], celle de la papaïne [361], de la rédosaxe [369], de la β amylase [184] grâce aux thiols.

Cependant la désinhibition n'apparaît pas toujours sous la forme simple d'une combinaison saline ou d'une réduction. Elle

peut résulter d'effets d'adsorption plus complexes. La gomme arabique qui protège l'uréase contre l'inactivation par le plomb agit probablement en constituant une enveloppe peu sensible aux ions autour de l'enzyme, de même que la gélatine défend l'or colloïdal contre l'action floculante des électrolytes [432]. C'est sans doute par le même mécanisme que les constituants colloïdaux qui accompagnent l'enzyme dans les extraits bruts tendent à altérer les effets d'activation et d'inhibition. L'activation de la carboxylase par la thiamine est attribuée à un effet concurrent protecteur de ce dernier corps qui empêche l'adsorption du coferment sur une substance thermolabile présente dans les extraits de levure. La présence des impuretés naturelles qui accompagnent l'enzyme ou qui sont fixées à des substrats insuffisamment purifiés, comme les traces de métaux inclus dans les protéines [258] a souvent fait confondre les désactivateurs et antiinhibiteurs avec les inhibiteurs et les activateurs [459].

Cette confusion est d'autant plus facile que le mécanisme d'action des effecteurs est toujours le même ; il repose sur un déplacement des trois équilibres enzymatiques. Cependant les préparations impures donnent lieu à des interprétations difficiles à cause de l'interréaction des effecteurs ; au contraire les activateurs et les inhibiteurs mis en action sur les enzymes purifiés permettent de caractériser les groupements actifs et de définir le mécanisme de la catalyse.

CONCLUSIONS.

L'extraction comme la purification des enzymes doit tendre à éliminer les colloïdes et les ions qui les accompagnent. Le choix des solvants et du temps d'extraction permet tout d'abord de limiter la solubilisation des protéines et des minéraux que les purifications éliminent par la suite. Ces opérations, en particulier l'adsorption et la dialyse, risquent parfois en dissociant l'enzyme soit de séparer les coenzymes organiques, les cations, les coactivateurs, tous corps de faibles poids moléculaires soit de dénaturer ou d'inactiver les supports protéiques. Par ailleurs les méthodes de fractionnement basées sur la résistance à l'action de la température ou aux ions H^+ et sur la précipitation par des réactifs organiques ou minéraux permettent souvent de séparer les enzymes agissant sur des substrats analogues ou à des pH différents. Cependant elles n'éliminent pas ou que d'une façon très imparfaite les impuretés qui peuvent modifier l'activation ou l'inhibition. C'est l'aspect sous lequel on envisage d'étudier la spécificité enzymatique qui détermine finalement le choix des techniques de purification à adopter.

Les multiples caractères de cette spécificité dont nous avons examiné les trois principaux aspects, constituent les critères généraux sur lesquels on peut se baser pour individualiser les enzymes. Ils participent à la fois de l'étude cinétique et de la simple description. Ils traduisent, malgré les particularités de chaque enzyme et la diversité apparente des phénomènes observés, un mécanisme d'action commun, lié à l'architecture uniforme des catalyseurs biologiques.

Les réactions enzymatiques sont régies par des lois générales dont on n'a jusqu'à présent dégagé la signification que d'une façon très limitée. Nous avons essayé, au cours de cette étude, de relier les divers aspects de la spécificité (en fonction du substrat, du pH, des effecteurs) et de montrer que les nombreuses variations observées pourraient être finalement rapportées au jeu des équilibres fondamentaux de la catalyse enzymatique. Nous nous sommes efforcés, en généralisant peut-être trop hardiment les connaissances acquises, d'ordonner des recherches selon un plan conforme à ces données et de raisonner par analogie sur les problèmes que pose la spécificité des phosphatases.

CHAPITE II.

SPÉCIFICITÉ DES PHOSPHATASES.

Les phosphatases hydrolysent les esters phosphoriques, les phosphoamides, les pyro- poly- et métaphosphates. L'étendue même de leur champ d'action pose le problème de leur unité. Les limites de la spécificité des phosphatases ont été mal définies du fait que ces enzymes ont été rendus responsables des réactions très différentes entre elles. C'est ainsi qu'on leur attribue un rôle considérable dans les phénomènes de fermentation alors qu'il est aujourd'hui hors de doute que les déphosphorylations accompagnées de transphosphorylations et de dégradations de la chaîne carbonée sont dues à des systèmes enzymatiques particuliers. Il est en effet certain qu'au cours de la glycolyse et de la glycogenolyse la déphosphorylation des polysaccharides [**50**], de l'hexosemonophosphate [**342, 99**], les transformations successives de l'adénosine en acide adénylique [**340**], adénosine pyrophosphorique, adénosinetriphosphorique sont dues à des enzymes spéciaux dont l'action est couplée avec des processus d'oxydoréduction et que les modes d'action et les propriétés de l'hexosekinase [**98**] de la phosphorylase [**102, 103**] de l'hétérophosphatèse [**56, 134, 133**] de la phosphatèse [**388**] sont différents entre eux. Il est très vraisemblable que ces enzymes sont distincts des phosphatases, dont l'activité ne semble en aucune manière liée à la présence de l'acide adénosinepyrophosphorique ou de l'hexosediphosphate comme celle de l'hexosekinase et l'hétérophosphatèse ; elle ne semble pas être induite non plus par la réaction : dioxyacétonephosphorique + acétaldéhyde $\rightleftarrows$ acide phosphoglycérique + alcool, comme celle de la phosphatèse ; enfin elle n'est pas spécifique de l'amidon ou du glycogène dont elle ne provoque pas la décomposition en esters de Cori comme la phosphorylase. La synthèse enzymatique de la cocarboxylase à partir de la vitamine B_1 en présence d'extraits de *levure* ou de *Propionibacterium pentosaceum* et d'un transporteur de phosphate (adénosinepyrophosphate, hexodiphosphate) relève également des processus d'oxydoréduction distincts

d'une simple estérification [140, 404, 410, 420, 447]. Assimiler à celle-ci l'activité phosphorylante ou déphosphorylante liée à un couplage de réactions [104, 151] ne peut que fausser la notion de spécificité enzymatique. La confusion qui règne à propos de l'existence d'enzymes spécifiques de la réaction

$$\text{alcool} + PO_4^{---} \longrightarrow \text{ester phosphorique} + H^2O$$

se renforce du fait que les variations d'activité synthétisante et hydrolysante sont généralement inverses l'une de l'autre au cours de la purification. En réalité cet état de choses tient non à la diversité d'enzymes spécifiques de la synthèse ou de l'hydrolyse mais à l'élimination d'activateurs de synthèse [425].

En outre la classification des phosphatases basée sur un certain nombre de critères insuffisamment fidèles ou inégalement appliqués aux divers types de préparation, aboutit au morcellement de ce groupe de catalyseurs en un grand nombre d'enzymes dont les différences ne sont pas toujours bien définies. La présente étude est destinée à soumettre ces critères à un nouvel examen basé sur des faits récemment acquis ; en particulier à définir la spécificité des phosphatases vis-à-vis des substrats, du pH et des effecteurs.

⁂

I. — Spécificité des phosphatases à l'égard des divers dérivés phosphoriques.

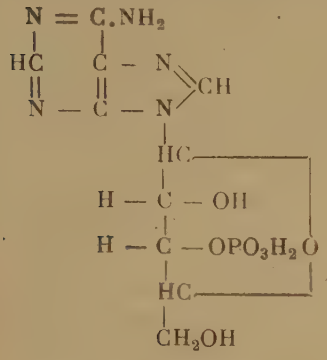
La subdivision du vaste groupe des estérases en estérases proprement dites, lipases, cholestérases, sulfatases, phosphatases et tannases, est essentiellement basée sur la nature soit de l'alcool, soit de l'acide estérifiés dans ce substrat. Elle répartit ces enzymes en deux groupes dont les membres seraient les uns plus sensibles à l'influence de l'alcool et les autres à celle de l'acide. Par ailleurs, la nature de l'acide ou de l'alcool peut aussi constituer un caractère de spécificité. Ainsi, dans le groupe des sulfatases, le glucose, la myrosine, la chondroïtine ou le phénol liés à l'acide permettent de distinguer encore différents types d'enzymes [154]. Le poids moléculaire, la structure, l'activité optique, le nombre des constituants unis aux oxhydriles acides ou alcooliques sont autant de facteurs de spécificité. Toutefois ces divers facteurs ont sur l'activité de plusieurs types d'enzymes une influence très inégale.

A. — Premier facteur de spécificité : influence de l'alcool ou du phénol liés au reste phosphorique.

Dans le cas particulier des phosphatases, la nature de l'alcool ou du phénol unis au radical acide exerce une influence très limitée. On a pu ainsi désigner sous le terme commun de phosphomonoestérases des enzymes hydrolysant les esters ortho-monophosphoriques des alcools ou des phénols les plus variés. La liste est longue des phosphates d'alcoyles aliphatiques (méthyl, éthyl, propyl, isopropyl, butyl, amyl, hexyl, cétyl, chloréthyl aminoéthyl [20, 21, 205, 206, 429] ou aromatiques (benzyl, phényléthyl, cyclohexanyl, methylcyclohexanyl, borneyl [329], menthyl ([220, 221], cholesteryl [248] qui peuvent être hydrolysés par les phosphatases. Le remplacement de l'alcool des polyols (glycérol, glycol) par des sucres ou leurs dérivés (hexosephosphates, acides phosphoglycériques, phosphopyruviques, phospholactiques [23, 82, 380]) ou par des phénols (phénol [217], p. nitrophénol [337], cresol [143], thymol ou bromothymol, m. et p. oxybenzoïque [291], dioxybenzol [291], naphtol ou bromonaphtol [303] modifie d'une façon insignifiante l'activité enzymatique. Le poids moléculaire, la structure de ces constituants n'exercent aucune influence importante. Seules les vitesses relatives d'hydrolyse peuvent être plus ou moins affectées à la suite de faibles variations d'affinité [105, 107, 109, 272, 372].

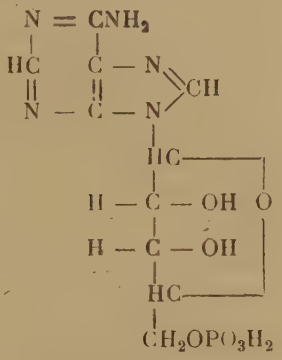
Par contre comme l'a souligné, le premier, Asakawa [20, 21], le degré de l'alcool uni au reste acide intervient dans la spécificité relative de certains types de phosphatases. A cet égard, le cas le plus net semble être celui de la 5-nucléotidase. Conformément à ce qui a été dit plus haut, la nature du nucléoside uni au reste phosphorique ne modifie pas la spécificité des phosphatases. Les nucléotidases soit-disant spécifiques, qui déphosphorylent les acides guanyliques, adényliques de levure, cytidyliques, uridyliques, hydrolysent également les glycerophosphates aux pH optima des diverses phosphoestérases (8-7-9 ou 4,5-5) ; elles sont influencées par les mêmes activateurs et inhibiteurs en présence de l'un et de l'autre substrat [83, 244, 245, 246, 247]. La 5-nucléotidase, au contraire, semble déphosphoryler spécifiquement [364] l'acide adénylique de muscle et l'acide inosique, dont le reste phosphorique est fixé, non comme dans les nucléotides précédents, à la fonction alcool en C_4 du ribose, mais à l'alcool primaire terminal. Ce caractère de spécificité qui semble être confirmé par de légères différences dans le pH optimum

d'action, la sensibilité à l'ion Mg^{++}, la répartition dans l'organisme, mérite d'être souligné.



Acide adénylique de levure

I



Acide adénylique de muscle

II

On le retrouve d'ailleurs à propos de l'hydrolyse des glycérophosphates de sodium dont les isomères α et β ne sont en général pas hydrolysés avec des vitesses égales par les diverses préparations. L'isomère β est en général hydrolysé le plus rapidement, mais les différences de vitesse de décomposition ne sont pas considérables dans ce cas ; elles sont par contre très fortes dans les préparations qui hydrolysent préférentiellement l'α glycérophosphate, à pH = 5,6-7 (*hématies* [**187, 204, 347, 369, 370, 372**]. *Propionibactérium* [**347**], *levure basse* [**385, 386, 387, 392, 393, 398**], *Aspergillus oryzae* [**42**], *feuilles d'amandier* [**109**]). Le dérivé α est alors beaucoup plus rapidement hydrolysé que l'isomère β. Les extraits glycérinés de levure basse desséchée hydrolyseraient même exclusivement l'α glycérophosphate et pourraient servir au dosage de ce sel dans un mélange des deux isomères [**386**]. La dialyse permet, selon Hashimoto, de séparer dans les hémolysats, deux fractions, l'une plus soluble hydrolysant l'α plus rapidement que le β glycérophosphate, l'autre moins soluble et hydrolysant les deux sels avec la même vitesse. Toutes ces données permettent d'envisager l'existence d'une α glycérophosphatase spécifique dont le pH optimum est aux environs de 6.

Mais dans le cas de la 5-nucléotidase comme dans celui de l'α glycérophosphatase l'influence du degré de l'alcool uni au reste acide est sujette à des variations. L'observation de Klein et Rossi [**249**], selon laquelle la nucléotidase d'intestin hydrolyse également les acides adenyliques de levure (I) et de muscle (II), met en cause la spécificité de cet enzyme. Celle de l'α gly-

cérophosphatase est plus fragile encore. Le caractère préférentiel de cet enzyme est fortement altéré soit au cours de l'extraction [104], soit au cours de certains traitements. Ainsi l'inactivation de l'hémolysat de sang à pH = 3,4 et à 37° fournit un produit qui hydrolyse avec la même vitesse les deux glycérophosphates de Na [187]. Par contre des préparations de reins [12, 13, 372], d'émulsine [104] qui déphosphorylent généralement l'isomère β plus rapidement que l'α présentent une inversion de ce caractère au cours de leur purification par dialyse [12, 13], par adsorption [372] ou par précipitation en milieu alcoolique ou ammoniacal [104]. La raison de ces variations pourrait résider dans la destruction au cours de l'extraction d'un facteur activant l'hydrolyse du dérivé α [251] ; mais elle pourrait aussi être recherchée dans le fait que l'inactivation partielle, tout en laissant inchangées les vitesses de dislocation des deux isomères, modifie d'une façon inégale l'affinité de la phosphatase vis-à-vis de l'un et de l'autre sels [104]. La modification des constantes d'affinité observée alors peut être due à celle de certains groupements du support colloïdal servant à la fixation du substrat. La spécificité de la 5-nucléotidase comme celle de l'α glycérophosphatase pourraient résulter, non de l'existence d'apoenzymes particuliers, mais de fines différences de structure d'un même apoenzyme. Cette interprétation rendrait compte du caractère continu des variations observées et éviterait de morceler le groupe des phosphatases en une multitude d'enzymes « spécifiques ». Etant donné le rôle peu important de la nature de l'alcool uni au reste phosphorique et celui, prépondérant du degré de l'alcool, il y aurait lieu de rechercher si la spécificité *secondaire* de la 5-nucléotidase et celle de l'α glycérophosphatase n'admettent pas le même support matériel. La combinaison du reste phosphorique à l'alcool primaire va de pair dans les deux cas, comme dans celui des esters d'alcools propylique et isopropylique [20, 21, 109] avec une modification d'affinité qui dépend probablement moins de la nature de l'ester phosphorique que d'une isomérie de position ou de l'introduction d'un C asymétrique [23, 59].

L'influence des rapports spatiaux se retrouve dans la spécificité optique des phosphatases. Ainsi les esters phosphoriques du racémate de bornéol [176], du méthylcarbinol [328, 329], du fenchol [335] sont hydrolysés avec déphosphorylation plus rapide de l'un des enanthiomorphes, et comme dans le cas des estérases proprement dites, l'addition d'alcaloïdes optiquement actifs amène une inversion de spécificité [268].

Dans l'ensemble ces résultats confirment l'influence minime

exercée sur l'hydrolyse phosphatasique par la nature de l'alcool uni à l'acide et le rôle plus important de son degré. Ils laissent supposer que le substrat ne se fixe sur l'enzyme que par certaines parties de la molécule.

B. — Deuxième facteur de spécificité : influence des groupements aminés unis au reste acide.

Le remplacement sur le reste phosphorique du constituant alcoolique ou phénolique par un groupement aminé peut modifier la spécificité. On peut *a priori* supposer que l'hydrolyse des liaisons esters et celle des amides sont catalysées par des groupements actifs différents. En fait, les préparations les plus diverses de takadiastase, de son de riz, d'émulsine, de venin de serpent, de rein, de trypsine, hydrolysent à des pH optima les plus variés (8-9 ; 5-5,5 ; 3,3) les phosphomono et diamides, le phénylphosphomonoamide, le phosphomonoanilide, le phénylphosphomonoanilide, le phosphomono p.chloranilide, le phénylphosphobenzamidine, l'acide guanyluridylique [3, 85, 142, 178, 210, 380, 382]. Les preuves de la spécificité de la phosphoamidase sont basées sur la séparation d'enzymes hydrolysant spécifiquement les esters phosphoriques et les phosphoamides. Ainsi l'adsorption des extraits rénaux additionnés à une solution tampon phosphatée sur $(OH)_3Fe$ fournirait un liquide actif sur le glycérophosphate et inactif sur l'amide [210]. Il a été observé également une différence dans la vitesse d'hydrolyse des esters phosphoriques et de la phosphocréatine [435]. La phosphoamidase serait, en outre, capable de déphosphoryler l'amidon de blé à l'inverse de l'amylophosphatase qui hydrolyse les liaisons esters phosphoriques de l'amidon de pomme de terre et reste sans action sur les liaisons phosphoamidées du premier amidon [435, 436, 437].

En réalité les documents sur la spécificité des phosphoamidases sont très peu nombreux. Les preuves de celle-ci basées sur des mesures de vitesse relative ne sont pas convaincantes : ainsi les préparations rénales purifiées qui hydrolysent 92 p. 100 de phosphocréatine déphosphorylent facilement 52,8 p. 100 de glycérophosphate [435] et celles qui libèrent 20 p. 100 du P de l'amidon de blé enlèvent également 16 p. 100 du P de l'amidon de pomme de terre [437]. Le fait que les phosphoamides ne sont pas déphosphorylés à pH = 8,5 par l'émulsine et le sont à pH 4,5 par la trypsine [436] ne constitue pas non plus un argument solide puisque l'émulsine est également sans action sur le glycérophosphate en milieu alcalin et qu'à pH = 5,6 des préparations de pancréas sont encore très actives sur les esters

phosphoriques (Roche, Nguyen van Thoai et Mlle J. Raymond, résultats non publiés). L'expérimentation avec des phosphoamides synthétiques est d'ailleurs rendue très délicate par la labilité particulière de leurs substrats dont l'hydrolyse spontanée est très importante [210].

La spécificité des phosphoamidases posant un problème théorique intéressant la connaissance des groupements catalysant l'hydrolyse des liaisons esters et amides, devrait être précisé par de nouvelles expériences. La mise en œuvre d'enzymes purifiés suffisamment actifs et agissant sur des substrats stables est nécessaire à son établissement.

C. — Troisième facteur de spécificité : influence des oxhydriles phosphoriques.

Si l'alcool, le phénol ou l'amine liés au reste acide ne déterminent qu'un caractère de spécificité secondaire et souvent peu marqué des phosphatases, le degré d'estérification du reste phosphorique joue par contre un rôle très important dans le déterminisme de la spécificité.

Les triesters, dépourvus de tous oxhydriles acides, insolubles, indissociables, ne sont hydrolysés par aucune des phosphatases connues [326, 328] et l'on admet que les esters monophosphoriques sont hydrolysés par des Phosphomonoestérases et les diesters par des diestérases.

Les di et monoesters phosphoriques se distinguent par le nombre des oxhydriles participant à la fixation probable de l'enzyme et par des différences dans le degré de dissociation électrolytique des fonctions acides, degré qui doit également intervenir dans la formation de la combinaison Enzyme-Substrat. D'une façon générale les diesters sont plus difficilement hydrolysables que les monoesters [20, 21, 370, 372, 429] comme l'a observé pour la première fois Asakawa [20, 21] à propos de la décomposition des dicresyl —, diglycéryl —, diéthylphosphates. Uzawa [429] admet que l'hydrolyse des diesters (diéthyl, diphényl, phénylethylphosphate) a lieu en deux étapes, la première libérant un monoester serait

$$O=P\begin{matrix}\diagup OR\\ -OR\\ \diagdown OH\end{matrix} + H_2O \rightleftharpoons O=P\begin{matrix}\diagup OH\\ -OR\\ \diagdown OH\end{matrix} + ROH$$

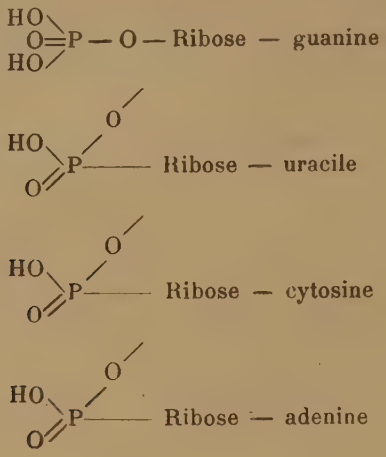
catalysée soit par un ferment spécifique, soit par la phosphomonoestérase ordinaire agissant en présence d'un activateur particulier. La préparation obtenue par adsorption sur alumine des solutions de takadiastase d'une monoestérase exempte de dies-

térase et la découverte dans les venins de *Trimesurus flavoviridis* d'un enzyme spécifique de l'hydrolyse des diesters ont établi l'individualité de cet enzyme [429], dont l'existence, contestée par Klein et Rossi [249] a été souvent mise en doute en raison des difficultés rencontrées dans son isolement. Si l'obtention d'une préparation douée d'activité monoestérasique et exempte d'activité diestérasique est relativement facile, l'opération inverse est des plus délicates [327]. Cependant les travaux de Udagawa [428] et ceux plus récents de Gulland et Jackson sur les venins *Agkistrodon piscivarus* et d'*A. Mokasin* [177, 178] semblent confirmer définitivement l'individualité de la diestérase. Par ailleurs il n'est pas impossible que l'on doive assimiler l'enzyme de venin de serpent que Belfanti, Contardi et Ercoli [62], désignent sous le nom de cholinephosphatase avec la diestérase de *son de riz* et *d'aspergillus* [428, 429] : la première hydrolyse le glycérophosphate de choline en choline et ester glycérophosphorique, la deuxième dédoublant le même substrat en glycérol et ester de la choline. L'importance minime des constituants unis au reste phosphorique dans le déterminisme de la spécificité des phosphatases permet de penser que la différence séparant les observations des divers auteurs peut provenir de l'emploi, comme substrat, du glycérophosphate de choline. Celui-ci dérive d'un mélange d'α et de β lysocithines, corps difficilement séparables. La position en α ou β du reste phosphorique dont nous avons souligné plus haut l'importance pourrait, par sa résistance à l'hydrolyse par certaines phosphatases, orienter l'attaque de certaines préparations sur la liaison ester cholinephosphorique. La diestérase présenterait alors le même caractère de spécificité secondaire que la phosphomonoestérase.

Le problème de l'individualité des diestérases est lié à celui de l'existence d'une amylophosphatase et d'une polynucléotidase. Dans l'amidon le radical phosphorique sert vraisemblablement à relier entre elles des chaînes latérales du polyoside ou à rattacher à un noyau central des chaînons plus courts. Il s'y trouve à l'état de diester et sa libération au moyen de l'amylophosphatase entraîne une fluidification de l'empois d'amidon ainsi que l'apparition de groupements réducteurs et de glucides de faible poids moléculaire [301, 383, 436, 437]. Les caractéristiques de cet enzyme spécifique devraient être comparées non avec celles de la phosphomonoestérase mais avec celles des diestérases, pour les raisons citées plus haut.

Il en est de même de la polynucléotidase dont le rôle consiste à dédoubler les acides nucléiques de levure ou de thymus en mononucléotides. La structure des polynucléotides, établie en

particulier à l'aide de mesures titrimétriques comporte probablement des liaisons esters phosphoriques



La libération des nucléotides dépend ainsi d'enzymes assimilables à des diestérases. L'individualité de la polynucléotidase est basée jusqu'à présent sur son indifférence vis-à-vis de l'arséniate de sodium et sur sa sensibilité au fluorure alcalin, le premier de ces corps inhibant la nucléotidase et le second n'exerçant sur celle-ci qu'une minime influence. L'identité, désormais acquise de la nucléotidase et de la phosphomonoestérase permet d'envisager la spécificité de la polynucléotidase vis-à-vis de la diestérase. L'identité de ces deux derniers enzymes affirmée par Takahashi à propos du venin de *Trimesurus* [414] a été confirmée récemment par les travaux de Gulland et Jackson [177, 178] ; l'association de la phosphomonoestérase et de la phosphodiestérase libère 75 p. 100 du P de l'acide nucléique de levure et le mélange monoestérase + nucléotidase 35 p. 100. En admettant que la monoestérase libère le reste phosphorique terminal du polynucléotide (monoester représentant 25 p. 100 du poids total) on peut remarquer que le mélange de monoestérase et de diestérase ne déphosphoryle pas totalement le polynucléotide et si la polynucléotidase doit être assimilée à une diestérase il convient de préciser l'influence du nombre des oxhydriles OH acides sur la vitesse et sur l'équilibre de cette réaction enzymatique. De toute manière les constituants unis aux restes phosphoriques n'exercent aucune action ; les acides nucléiques de levure ou de thymus sont hydrolysés de la même façon [84, 86].

Les caractères de spécificité de la polynucléotidase, de l'amylophosphatase et finalement de la phosphodiestérase mettent une

fois de plus en relief l'influence du degré d'estérification du reste phosphorique.

Il semble d'ailleurs que celle-ci est plus importante que le rôle joué par le nombre des oxhydriles acides libres présents. C'est ainsi que l'acide diphosphoglycérique, qui, malgré ses quatre OH phosphoriques libres, est hydrolysé comme un monoester ordinaire. Il en est de même pour l'hexosediphosphate. Depuis les travaux préliminaires de Ohmiya [336] il ne semble pas qu'il soit apporté de preuves sérieuses de l'existence d'une hexosediphosphatase spécifique [200, 435]. L'individualité de la phytase constitue au contraire une exception intéressante dans laquelle il faudrait voir l'influence du noyau cyclanique. L'hydrolyse de l'hexaphosphate d'inositol, dont la première observation faite par Suzuki [413] a inauguré les recherches sur les phosphatases, est due à un enzyme dont la spécificité est basée jusqu'ici soit sur l'obtention de préparations actives sur les monoesters et inactives sur la phytine [205, 344, 362], soit sur les vitesses d'hydrolyse différentes de la phytine et d'esters phosphoriques ordinaires [370]. Le caractère préférentiel de l'enzyme est déterminé par le nombre de restes acides ; ainsi des préparations actives sur le monophosphate d'inositol n'hydrolysent guère la phytine [89]. L'influence des mêmes restes phosphoriques a amené à distinguer les pyrophosphates qui hydrolysent les liaisons anhydridres des pyrophosphates minéraux et organiques en orthophosphates et en esters orthophosphoriques. Basée initialement sur des légères différences de pH optima d'hydrolyse [231] et sur une répartition inégale dans l'organisme [370], la distinction entre phosphoestérases et pyrophosphatases semble être justifiée par la possibilité d'isoler ce dernier enzyme des autres phosphatases avec lesquelles il coexiste. Les méthodes de séparation employées (adsorption [267, 414], inactivation thermique [56], résistance à l'action des acides [31]) s'expliquent soit par la dissociation de l'un des enzymes [Albers], soit par la destruction de l'un de ses constituants, probablement de l'apoferment. Les pyrophosphatases et les phosphomonoestérases posséderaient un même coenzyme et des apoenzymes différents [10, 748] ; aucune preuve expérimentale n'est cependant venue confirmer cette notion et la spécificité des pyrophosphatases reste incertaine en raison de nombreux caractères communs qu'elles présentent avec les phosphoestérases : pH optimum d'action identique dans la zone acide (3,5-4 et 5,5), activation par Mg^{++} en milieu alcalin et indifférence au milieu acide au même cation [29, 45], sensibilité égale aux cations divalents Mg^{++}, Mn^{++}, Fe^{++}, Co^{++}, Ni^{++}, Cd^{++} en milieu alcalin [32, 37]. Notre connaissance des

phosphoestérases permet de prévoir que les caractères des pyrophosphatases ne seront pas modifiés par les radicaux organiques : phényl [328, 332, 418], ocresyl ; m-crésyl et α naphtyl [328], oxyquinoléine [219], l et dl fenchyl [335], aneurine [448]. Le dédoublement de ces esters a été d'abord attribué à l'action d'une pyrophosphatase spéciale ou à celle d'un pyrophosphatase agissant en présence d'un activateur [267]. Elle a été, plus tard, attribuée à l'action additive de deux enzymes : une pyrophosphatase et une monoestérase mais cette assertion ne s'appuie sur aucune donnée expérimentale [326], car en aucun cas l'influence des radicaux carbonés en dehors de l'asymétrie moléculaire [335] ne s'est manifestée.

Par contre les caractères de l'action enzymatique sont modifiés dès l'introduction dans la molécule d'un nouveau reste phosphorique. L'adénylpyrophosphatase est activée ainsi par SO_4^{--} qui est sans action sur celle-ci [53]. La spécificité de cet enzyme [53, 54, 130, 144, 218, 282] dont l'existence est parfois contestée [182, 384], semble trouver une confirmation dans la découverte récente d'activité tri et polyphosphatasique dans diverses préparations végétales et animales [325, 326, 327]. Le mécanisme d'action de ces enzymes reste cependant obscur ; il est difficile de préciser le point d'attaque de l'adénylpyrophosphatase et la nature des premiers produits libérés [182, 282]. En tous cas l'influence du reste phosphorique est visible : c'est son degré d'estérification qui conditionne les caractères de spécificité secondaire.

Probablement les mêmes faits déterminent également l'individualité des métaphosphatases qui accélèrent l'hydratation des métaphosphates [243] [284]

$$PO_3H + H_2O \longrightarrow PO_4H_3$$

La spécificité de ces enzymes est basée en particulier sur des traitements thermiques qui respectent dans les diverses préparations l'activité métaphosphatasique et détruisent les autres phosphatases [325].

CONCLUSIONS.

Malgré la différence dans la nature des réactions d'hydrolyse des pyrophosphates, des esters orthophosphoriques ou des phosphoamides, et d'hydratation des métaphosphates, les divergences de nombreux caractères (pH optima d'action, activabilité) présentés par les enzymes qui catalysent ces multiples réactions ne sont pas considérables.

Ce fait, *primordial*, traduit un certain manque de spécificité à

l'intérieur du groupe des phosphatases. Le rôle secondaire des radicaux alcooliques, phénoliques, aminés unis au reste phosphorique et celui, évident, des OH acides libres, laissent supposer que ceux-ci interviennent probablement dans la fixation du substrat à l'enzyme. En outre l'hydrolyse des divers dérivés phosphoriques par les gels d'hydroxydes de terres rares (La, Pr, Ce, etc...) et de certains métaux tels que Mn, Fe, Mg, Al [27, 36] permet de penser que la formation de la combinaison Enzyme-Substrat pourrait se produire par l'intermédiaire de cations fixés par l'apoenzyme. Cette interprétation explique que l'influence des restes phosphoriques, si elle est réelle, ne détermine finalement que des caractères de spécificité secondaire, propres aux fines variations de structure de certains groupements de l'apoenzyme. Il n'y a pas de différences fondamentales entre les divers types de phosphatases : les uns et les autres présentent toujours entre eux de grandes analogies.

***

II. — pH optimum d'hydrolyse phosphatasique.

Ce caractère d'uniformité s'observe encore lorsqu'on compare les pH optima d'action des phosphatases. Si la plupart des valeurs observées semblent graviter autour des pH principaux : 4-5,5-6-9 et justifier jusqu'à présent la division des phosphatases en quatre types, elles n'excluent aucunement l'existence de pH optima intermédiaires. Il serait plus exact, en rassemblant le plus grand nombre de données établies de parler d'une phosphatase « très acide » (pH = 2,5 à 4,5), « peu acide » (pH = 4,6 à 5,8), « neutre » (pH = 6-7) et « alcaline » (7,4-9,5). Tous les termes de passage existent d'un tissu à un autre et parfois, pour une source biologique déterminée, d'un type de préparation à un autre. A côté de ces variations qui affirment une grande homogénéité dans le groupe des phosphatases, il existe une prédominance très nette des phosphatases « alcalines » dans les tissus animaux, de phosphatases « très acides » chez les microorganismes (levures, aspergillus, bacteries) et de phosphatases « peu acides » chez les végétaux verts. Ce qui a conduit certains auteurs à conclure, hâtivement, à la présence exclusive d'un groupe donné de phosphatases dans certains tissus [10].

L'existence de plusieurs pH optima d'hydrolyse s'observe, non seulement dans l'hydrolyse des monoesters orthophosphoriques, mais dans celle d'autres substrats : diesters, pyro-poly-phosphates, phosphamides. Ce fait implique sans doute une grande simi-

litude entre les divers enzymes et souligne le caractère d'uniformité que nous avons noté plus haut, et que traduit l'expression « isodynames » appliquée par BAMANN aux enzymes de même spécificité fine. Il laisse prévoir que les apoenzymes, probablement responsables de la spécificité des phosphatases, à l'égard de divers substrats, présentent les mêmes caractères de dissociation.

A. — INDIVIDUALITÉ DES PHOSPHATASES ISODYNAMES.

Elle a été caractérisée en particulier par la spécificité de certaines phosphatases vis-à-vis de l'α et du β glycérophosphate. L'école japonaise avec ASAKAWA soutenait que le degré de l'alcool (I ou II) lié au reste phosphorique déterminait les particularités de la cinétique de l'hydrolyse : les esters d'alcool II (β glycérophosphate, isopropyl- phényléthyl- benzyl- phenyl- cresyl- phosphate) seraient hydrolysés à pH = 3 et ceux d'alcool I (α glycéroacétone- glycol- phosphate) à pH = 5,5 [20, 21]. La mise en évidence dans les hématies [370...], dans la levure [385, 386, 387], dans l'Aspergillus oryzae [43, 20, 233] d'enzymes hydrolysant à pH = 6-6,4 l'α glycerophosphate plus rapidement que le sel β renforce l'opinion que les phosphatases présentent une double spécificité à la fois vis-à-vis du substrat et du pH. L'espoir d'individualiser les phosphomonoestérases isodynames par d'autres caractères que leur pH optimum d'action se heurte cependant à l'inconstance du critère choisi. Ainsi les préparations d'hématies dialysées ou traitées par les acides hydrolysent à pH = 5,6 l'isomère β plus rapidement que α [187]. L'émulsine d'amande douce déphosphoryle généralement les deux isomères avec la même vitesse à pH = 5,5 ; après inactivation partielle à l'ammoniaque ou à l'alcool, elle hydrolyse préférentiellement le dérivé α [104] au même pH. Certains extraits végétaux hydrolysent d'ailleurs ce dernier plus rapidement que son isomère β à pH = 8,0, alors qu'à ce pH la déphosphorylation du β glycérophosphate est en général plus forte.

Le deuxième critère de spécificité est constitué par le comportement des phosphatases vis-à-vis des effecteurs. A cet égard les fluorures alcalins sont les plus utilisés dans la distinction des phosphatases acides et alcalines. Il paraît établi que l'anion F^- se montre progressivement inhibiteur à mesure que la valeur du pH diminue (voir p. 56). Malgré quelques observations contradictoires [63, 280, 400], il ne paraît pas exercer d'action appréciable sur les phosphatases alcalines et inhibe les enzymes au pH optimum acide. La confirmation de cette différence tendrait à prouver que les enzymes seraient constitués par des com-

plexes métalliques dont la stabilité et le pouvoir réactionnel dépendent du pH. C'est d'ailleurs sur les différences de stabilité du complexe enzymatique que sont basées la plupart des méthodes de séparation des phosphatases isodynames.

Ces premiers essais d'individualisation ont été réalisés par l'école japonaise au moyen de techniques d'adsorption (Asakawa [20, 21], Kobayashi [251], Uzawa [429]). Ils ont permis ainsi de mettre en évidence la pyrophosphatase de pH optimum = 7,5 [267]. On a séparé de la même manière la phosphomonoestérase de pH = 4 dans l'urine [39], celle de pH = 5,6 dans les hémolysats [204], celle de pH = 6-7 dans la levure basse [56, 392].

La dialyse basée sur la dissociation des constituants de l'enzyme permet d'atteindre le même résultat. Les extraits acétiques de foie dialysés ne présentent plus d'activité vis-à-vis du pyrophosphate en milieu alcalin ; ils ont alors un pH optimum = 5,6 [31]. De même il a été observé un déplacement du pH optimum vers l'acidité sur les extraits de levure dialysés [393].

L'inactivation sélective par les méthodes d'adsorption ou de dialyse, ne suffit pas toujours à démontrer l'individualité des phosphatases isodynames. Les deux techniques mises en œuvre peuvent aussi bien séparer deux enzymes associés dans une même préparation, qu'éliminer un activateur ou un inhibiteur dont la présence peut modifier les caractères de l'extrait enzymatique. Elles gagnent à être complétées par des essais d'activation ou d'inhibition aux divers pH.

La méthode de choix, pour individualiser les phosphatases isodynames, semble être constituée par l'inactivation sélective en milieu légèrement acide ou alcalin. Les recherches de Albers H., Kutscher, Bamann, de Belfanti et de leurs collaborateurs ont montré que les phosphatases acides s'inactivent rapidement en milieu alcalin (pH > 6) et les phosphatases alcalines en milieu acide (pH <6). L'extraction de durée variable en milieu acétique (n/25) ou ammoniacal (n/40) permet d'obtenir l'une des phosphatases par dissociation des autres en leurs constituants. Un bref traitement thermique (séjour à 37°) augmente la vitesse d'inactivation et complète la séparation [29, 30, 31, 39, 63, 117]. Les résultats obtenus trouvent leur explication dans les travaux de H. Albers et de ses collaborateurs ; ils mettent en évidence l'influence de la concentration en ions H^+ sur la stabilité des phosphatases et sur leur dissociation en apoenzymes et coenzymes.

B. — Action du pH sur les phosphatases.

L'amphotérie de celles-ci a été mise en évidence par l'école japonaise avec Kobayashi, Inouye [212, 251]. Pour ces auteurs, la takaphosphatase (pH optimum = 3) est un ampholyte, actif à l'état indissocié tandis que la phosphatase rénale (pH optimum = 9) agit à l'état dissocié et pour Kutscher la phosphatase de la prostate est un ampholyte dont le point isoélectrique (4,1) ne se confond pas avec le pH optimum d'action (pH = 5,6) [269]. L'influence du pH sur la stabilité des phosphatases a conduit par ailleurs H. Albers à supposer que les phosphatases « acides » se dissocient en milieu alcalin et les phosphatases « alcalines » en milieu acide. La dialyse dans les zones de pH où a lieu la dissociation a permis à H. Albers et à ses collaborateurs [14] et à D. Albers [4, 5] de séparer les constituants de la phosphatase « alcaline » rénale et de la phosphatase « acide » de levure. Le coferment, commun et interchangeable, peut ensuite servir à réactiver l'apophosphatase « acide » ou « alcaline ». La « resynthèse » des enzymes, réaction d'adsorption, ne survient qu'au bout d'un certain temps d'incubation à 37° et à un pH optimum déterminé par la nature de l'apoenzyme.

L'interprétation que H. Albers et ses collaborateurs, que D. Albers, donnent de leurs résultats permet d'expliquer l'existence de plusieurs pH optima d'action en même temps qu'elle montre la constitution dualiste des phosphatases. L'influence de la concentration en ions H^+ s'exercerait donc essentiellement sur la dissociation de la phosphatase et le pH optimum d'hydrolyse correspondrait à l'état de stabilité de l'holoenzyme.

Il est néanmoins permis de penser que le pH agit en outre sur l'*ionisation des dérivés phosphoriques* et sur leur combinaison avec l'enzyme.

La nature du substrat détermine en effet de légers décalages dans le pH optimum d'hydrolyse. Pour Asakawa [21], le pH optimum d'action de la takaphosphatase dépend des constantes de dissociation de l'enzyme et du substrat.

$$pH = \frac{pKf + pKs}{2}$$

$$Kf = \frac{[\text{Ferment-anion}]\,[H^+]}{[\text{Ferment total}] - [\text{ferment anion}]}$$

$$Ks = \frac{[\text{Substrat-anion}]\,[H^+]}{[\text{Substrat total}] - [\text{substrat anion}]}$$

Le β glycérophosphate dont la première fonction acide est complètement dissociée, réagit à l'état d'ions tandis que la takaphos-

phatase dont pK = 4,8 est alors à l'état d'ion mixte (Zwitter ion) et que par ailleurs sa dissociation en apo- et coenzyme est minime. Cependant le développement mathématique et les données expérimentales fournies par l'auteur japonais ne concordent pas tout à fait avec les résultats obtenus dans l'étude de la phosphatase alcaline. Les recherches plus récentes de H. Albers et de ses collaborateurs montrent, contrairement à celles de Asakawa, que la phosphatase alcaline agit également à l'état d'holoenzyme non dissocié comme la takaphosphatase et comme l'enzyme de la prostate. De toute manière les monoesters sont hydrolysés par les hématies (pH = 8,4-8,8) à un pH sensiblement différent des diesters (pH = 7,6-7,7) [187] ; le pyrophosphate est hydrolysé à pH (7,4-8,4) toujours plus bas que le glycérophosphate (pH = 9) [372]. Parfois les différences entre les pH optima d'hydrolyse sont très grandes d'un substrat à l'autre : certaines bactéries hydrolysent ainsi le glycérophosphate à pH = 10,7 et l'hexosemonophosphate à pH = 6,6 [349]. Ces variations dans le pH optimum d'action des phosphatases ont souvent servi d'argument à la spécificité de certaines de celles-ci. En réalité ces variations dépendent non seulement de l'origine des extraits enzymatiques mais en partie de la concentration du substrat.

Pour Courtois, le pH optimum d'hydrolyse des deux glycérophosphates résulte de l'antagonisme de l'affinité de l'enzyme pour les deux isomères et de la vitesse propre d'hydrolyse du substrat par les groupements actifs. L'affinité est favorisée par un abaissement du pH et l'action hydrolysante des groupements actifs par une diminution de l'acidité. Aux faibles concentrations en substrat, le premier facteur l'emporte sur le second et le pH optimum de la takaphosphatase se situe entre 3,5 et 4,0, tandis qu'aux fortes concentrations en substrat où l'enzyme est pratiquement saturé en substrat et où le rôle de l'affinité devient négligeable, le pH optimum est de 5,3, correspondant à la vitesse maxima d'hydrolyse [104].

De tels déplacements de pH en fonction de la concentration en substrat ont été également notés à propos de la phosphatase « acide » de pH = 5-6 du sérum sanguin [287]. Les variations montrant l'existence d'une relation directe entre le pH et les constantes des réactions phosphatasiques illustrent la nécessité de ne pas modifier ces dernières dans la détermination des pH optima d'hydrolyse.

C. — Facteurs modifiant le pH optimum.

Le pH peut être altéré dans les expériences de longue durée par une dénaturation partielle de l'apoenzyme. Dans ce cas le pH optimum ne correspond pas à celui où la vitesse d'hydrolyse est maxima, mais à celui où, celle-ci étant encore mesurable, la destruction de l'apoferment ou la dissociation de l'enzyme est plus faible. Il en est souvent ainsi, en particulier dans les milieux biologiques complexes où l'enzyme est accompagné d'une grande quantité de protéines étrangères dont la dénaturation provoque une perte de l'activité phosphatasique par collage de l'enzyme aux précipités. Le pH optimum d'action des phosphatases est encore modifié par la proportion des activateurs et inhibiteurs présents.

Kobayashi [251], Inouye [212] ont montré que la takaphosphatase est accompagnée d'une « substance X » qui inhibe davantage l'enzyme à mesure que le pH du milieu s'abaisse. En présence de ce corps, les extraits d'Aspergillus oryzae présentent un pH optimum = 5,6 ; après son élimination par adsorption sur alumine ou dialyse celui de la takaphosphatase est de 2,7 à 4 [251, 212, 43]. Cette substance coexiste d'ailleurs avec un anti-inhibiteur naturel et c'est la proportion relative des deux corps dans la préparation enzymatique qui détermine finalement le pH optimum mesuré [43]. Le citrate joue le même rôle que l'anti-inhibiteur ; il localise l'effet de la substance X entre pH 3 et 4 ; en d'autres termes il diminue l'affinité de celle-ci pour l'enzyme dans les zones de moindre acidité. Un certain nombre d'oxyacides jouent le même rôle que le citrate [44].

Des artefacts analogues s'observent lorsque certains activateurs exercent inégalement leur influence aux divers pH. Ainsi les préparations lyoenzymatiques de foie renferment une pyrophosphatase de pH optimum = 5,6 et une pyrophosphatase « alcaline » qui se montrent nettement en l'absence de magnésium ; l'addition de ce cation, activateur du dernier enzyme, fait apparaître un nouveau pH optimum = 6, artefact résultant de l'action simultanée des deux enzymes [31]. Il existe parfois un véritable décalage du pH optimum ; selon Demuth, Ca^{++} et Mg^{++} déplacent le pH optimum vers l'acidité [117] ; pour Schäffner et Krumey les extraits de levure électrodialysés ne sont plus activés par Mg^{++}, mais présentent, lors de l'addition de ce cation un pH optimum moins élevé [393]. Les variations du pH optimum d'hydrolyse phosphatasique sous l'action des tampons ou des cations ne sont toutefois pas régulières [41, 114] ; aussi peut-on penser

qu'elles traduisent l'activation ou l'inhibition des mélanges d'enzymes.

Pour des préparations brutes, le pH optimum présente une signification plus biologique que chimique ; il correspond moins à une propriété de l'enzyme qu'à un état particulier de ce dernier.

CONCLUSIONS.

Les faits que nous venons de résumer montrent la fragilité de la caractérisation des nombreuses phosphatases isodynames. L'individualité de celles-ci ne peut être affirmée avec quelque sécurité que lorsqu'elle a été établie sur des préparations suffisamment purifiées, très actives et présentant une constance absolue de caractères.

Toutefois l'ensemble des observations montre que le pH optimum des phosphatases traduit bien l'influence des ions H^+ sur les trois équilibres enzymatiques. Cette action s'exerce cependant d'une façon prépondérante sur la stabilité du complexe enzymatique et sur ses propriétés. Phosphatases acides et alcalines semblent se distinguer essentiellement par les caractères de leur dissociation en apoenzyme et coenzyme, qui restent les mêmes quelle que soit la nature du substrat envisagé.

⁂

III. — Effecteurs des phosphatases.

Le comportement des phosphatases à l'égard de divers substrats comme du pH indique seulement d'une façon imprécise les relations entre la spécificité de ces enzymes et la nature de leurs groupements actifs. On pouvait espérer que l'étude des effecteurs permettrait de caractériser ces derniers, l'action de ces corps pouvant porter soit sur le coferment, directement responsable de l'hydrolyse phosphatasique ou sur certains groupements de l'apoenzyme grâce auxquels se fixe le substrat.

A. — Inhibiteurs.

La spécificité et la réversibilité de l'action de ces corps dominent le problème de l'inactivation des phosphatases. Elles permettent de définir l'individualité des phosphatases à l'égard des substrats et du pH.

1° *Inactivation spécifique.* — Il ne semble pas exister d'inhibiteur agissant spécifiquement sur l'hydrolyse d'un dérivé phos-

phorique particulier. Cette remarque confirme l'absence de relation entre la spécificité des phosphatases vis-à-vis des divers substrats et la nature des groupements actifs qui catalysent la décomposition de ceux-ci.

Le nombre d'inhibiteurs agissant spécifiquement à un pH donné est également restreint. Ainsi les oxalates alcalins semblent inactiver aussi bien les phosphatases « acides » [63] que les phosphatases « alcalines » [400]. Leur action est réversible et leur élimination par précipitation à l'état de sels de calcium ou par dialyse permet de réactiver la phosphatase [Belfanti, Contardi et Ercoli].

Contrairement aux oxalates, les fluorures présentent une action plus spécifique. L'ensemble des résultats obtenus tend à montrer qu'ils inhibent davantage l'hydrolyse phosphatasique à mesure que le pH est plus bas. Faible à pH = 6, leur action s'accentue considérablement à pH = 4-3 [22, 43, 63, 117, 212, 254, 315]. Selon l'opinion générale l'inactivation par F^- est irréversible et ne régresse ni par la dialyse ni par addition de métaux tels que Mg^{++}, Ca^{++}, Fe^{++}, Cu^{++} [58, 63, 212]. Pour Courtois, FNa diminue la vitesse de décomposition du substrat par les groupements actifs de l'enzyme en même temps qu'il augmente la stabilité de la combinaison enzyme-substrat [110]. Cependant Kutscher a constaté que l'inhibition par FNa augmente lorsque la concentration du substrat diminue ; ce qui doit être interprété comme le résultat de la fixation du fluorure à l'enzyme à la place du substrat [273, 274]. Le degré d'inhibition dépend ainsi du rapport d'affinité des divers substrats d'une part et du fluorure d'autre part vis-à-vis de l'enzyme : l'hydrolyse du pyrophosphate est plus fortement inhibée par F^- que celle des esters phosphoriques [349] et celle du glycérophosphate plus que celle du phénylphosphate [250, 273, 274]. L'affinité du fluorure pour les enzymes dépendrait à son tour du métal participant à l'activité de ces derniers : la pyrophosphatase de levure pleinement activée par Mg est plus sensible à l'inhibition par FNa qu'un enzyme incomplètement activé [58]. Selon Massart et Dufait le fluorure, s'unissant plus facilement à Mg, inhiberait davantage les phosphatases activables par Mg (phosphatases de foie, de levure) que celles activables par Co ou Mn (phosphatases de rein) [298]. Cependant l'influence du fluorure ne semble pas liée au *degré d'« activabilité »* des phosphatases par Mg ou par un autre cation ; il est même de règle que les phosphatases les plus sensibles à F^- sont celles qui sont inhibées par Mg [11] ou indifférentes à ce métal [104, 158]. Ces contradictions montrent que le mécanisme d'action du fluorure reste obscur. S'il est vraisem-

blable que FNa agit en bloquant les groupements métalliques de l'enzyme, les conditions dans lesquelles se forme le complexe protéine-métalfluorure restent à déterminer. Le pH, la proportion relative d'activateur et de coactivateur et l'affinité de ceux-ci pour l'enzyme constituent autant de facteurs qui règlent l'action inhibitrice du fluorure et expliquent les contradictions rencontrées dans la littérature.

L'action du fluorure rappelle celle d'*inhibiteurs naturels* dont l'effet se localise à certaines zones de pH. C'est ainsi que la « substance X » de l'Aspergillus oryzae inactive davantage la takaphosphatase à mesure que l'acidité du milieu augmente et l'étude cinétique de son action montre qu'elle ne modifie pas la dissociation de l'enzyme-anion mais celle des groupements électropositifs de l'ampholyte. Il s'agirait d'une véritable combinaison des groupements basiques de l'enzyme avec l'inhibiteur électronégatif [**212, 251**]. L'influence du pH sur la formation du complexe inactif enzyme-effecteur X est manifeste en présence des citrates alcalins lesquels, comme un certain nombre d'oxyacides, ont pour effet de limiter l'action de l'inhibiteur entre pH 3 et 4 [**44**].

Ces faits montrent que l'inactivation spécifique des phosphatases acides par les fluorures comme par la substance X semble résider dans les conditions de formation du complexe enzyme-inhibiteur ; celles-ci sont surtout liées à la concentration en ions H^+ du milieu.

2° *Inactivation réversible.* — Définir les circonstances dans lesquelles l'inhibition demeure réversible permet de mieux connaître le mécanisme de celle-ci. La réversibilité est liée à un facteur important : la concentration de l'inhibiteur, dont les effets se superposent souvent à celui du corps étudié. En effet les caractères des solutions de protéines enzymatiques peuvent être modifiées au dessus d'une certaine concentration saline limite, et de plus, la nature des complexes métalliques formés varie avec la proportion des corps en présence. L'étude des variations d'activités phosphatasiques en fonction de la concentration en inhibiteur a fourni des courbes de deux types. La première enregistre une diminution progressive de l'activité enzymatique, paraissant correspondre à une baisse constante de la teneur en enzyme actif, lorsque la concentration de l'inhibiteur augmente. La seconde accuse, pour de très faibles concentrations en inhibiteur, une légère accélération de la vitesse d'hydrolyse, laquelle diminue rapidement lorsque la proportion de l'effecteur continue à croître. L'action du fluorure, de l'oxalate, des inhibiteurs naturels, du phosphate appartient au premier type d'inhibition ;

celle des thiols, du cyanure, de certains formateurs de complexes, au second.

Comme le fluorure et l'oxalate, les phosphates minéraux diminuent progressivement la vitesse d'hydrolyse à mesure que la teneur du milieu en ions PO_4^{---} augmente [117, 218, 293], leur action étant d'autant plus forte que la concentration en substrat est plus faible. L'inhibition concurrente, provenant de la fixation de l'ion PO_4^{---} sur l'enzyme à la place du substrat, et qui dépend du rapport [Phosphate]/[substrat] est probablement accompagnée de la formation d'une autre combinaison inactive de l'anion avec l'enzyme, laquelle dépend seulement de la teneur du milieu en phosphate inorganique [218]. Les deux phénomènes ont pour résultat de réduire la quantité d'enzyme actif. Il en découle que les mesures de la vitesse initiale d'hydrolyse doit donc se faire avant que les produits de la catalyse enzymatique n'inhibent la phosphatase. En l'espèce le glycérol ou l'alcool libérés ne semblent exercer aucune influence importante [104, 151, 230] tandis que l'ion PO_4^{---} exerce déjà son effet lorsqu'une faible partie du substrat est hydrolysée. Ces faits confirment la conclusion que nous avons tirée lors de l'étude de la spécificité relative des phosphatases vis-à-vis des divers substrats, à savoir que ceux-ci se fixent sur l'enzyme probablement par le reste phosphorique.

Les arséniates, sels très voisins des phosphates, exercent sur les phosphatases la même inhibition que ceux-ci [245, 315, 330] sans doute par un mécanisme identique. Toutefois l'action des arséniates est encore moins bien définie que celle des phosphates, en raison de la confusion qui tend à rapporter à l'activité phosphatasique nombre de processus de phosphorylation et de déphosphorylation complexes, sensibles à la présence de l'ion arsénique intervenant au cours de la glycolyse et de la glycogenolyse. L'action inhibitrice des composés phosphorylés tels que la cozymase [11, 58] relève probablement du même phénomène de concurrence vis-à-vis du substrat.

Une autre forme de cette inhibition se présente dans l'action de certains inhibiteurs naturels que l'on rencontre dans les préparations de reins [12], de levures [11] et qui peuvent s'éliminer par dialyse ou encore par autolyse [11, 12, 76, 125]. Les inhibiteurs se forment par traitement de la cophosphatase à chaud et à pH acide et leur action est empêchée par la présence d'un excès de celle-ci [14]. Il résulte de ce dernier fait que l'inhibiteur semble entrer en concurrence avec le coenzyme.

L'action inhibitrice de certains métaux sur les préparations enzymatiques insuffisamment purifiées s'explique de la même

manière. Le calcium, que les recherches récentes désignent comme un activateur au même titre qu'un certain nombre d'autres cations divalents, a été longtemps considéré comme inhibiteur [45, 53, 58, 251]. Il ne l'est en fait que s'il entre en concurrence avec le Mg dans des préparations phosphatasiques complètement activées par ce dernier. A cet égard les phosphatases suivent une règle générale, selon laquelle l'addition à un enzyme déjà pleinement activé d'un cation, même activateur par lui-même, entraîne une diminution d'activité.

L'action des thiols, de CNK, de certains formateurs de complexes, affecte une allure différente. Légèrement activateurs à très faible concentration, ils deviennent très fortement inhibiteurs lorsque celle-ci augmente.

Le mécanisme d'action des thiols a été d'abord rapporté au potentiel d'oxydo-réduction [104, 434, 438]. Les recherches montrant que la cystéine, le GSH sont légèrement activateurs aux faibles concentrations (m/1.000 — m/10.000) et inhibiteurs à des doses plus fortes [125, 253, 116, 284] laissent cependant supposer que ces corps agissent en tant que formateurs de complexes. Dans un premier temps ils favorisent l'hydrolyse en éliminant l'excès de métaux lourds inactivant l'enzyme ; ils bloquent ensuite les constituants métalliques de la phosphatase dont ils diminuent l'activité. Cette manière de voir explique également l'action de CNK [125] qui serait due à l'élimination successive des cations inhibiteurs et activateurs, au fur et à mesure de l'enrichissement du milieu en radical formateur de complexes.

Il est vraisemblable que l'action tantôt activatrice, tantôt inhibitrice de certains corps, tels que l'acide ascorbique [110, 159, 161, 240, 359, 416, 417], les acides biliaires [151, 147] s'explique aussi par la facilité avec laquelle ces corps s'unissent aux cations. Les mécanismes des diverses inhibitions déterminent les conditions de leur réversibilité. Lorsque l'inhibition est due à une concurrence avec le substrat ou avec le coferment, elle peut disparaître lors de l'élimination de l'inhibiteur par dialyse (PO_4^{---}, ASO_4^{---}, oxalate, substance X] ou par adsorption [substance X]. L'inhibition peut aussi tenir à la combinaison des formateurs de complexes aux groupements métalliques constituant les phosphatases ou faisant partie de leur système activateur. Si les cations forment avec l'enzyme un système indissociable l'inhibition disparaît par élimination de l'effecteur à la suite de la dialyse ; dans le cas contraire, celle-ci élimine en même temps le métal et le formateur de complexe et la dialyse fournit finalement un enzyme beaucoup moins actif.

Les travaux de Cloetens sont en accord avec cette manière

de voir. La phosphatase alcaline rénale, par dialyse prolongée contre CNK et l'eau perd 92 p. 100 de son activité [97]. Il résulte des essais d'inactivation des phosphatases alcalines que ces dernières comportent vraisemblablement dans leur structure des éléments métalliques, lesquels peuvent être bloqués par des formateurs de complexes et éliminés en même temps que ces derniers au cours de la dialyse. Les phosphatases acides se comportent de la même manière vis-à-vis des phosphates et des arséniates. La présence des métaux dans leur édifice moléculaire semble être également démontrée par l'action de l'oxalate, du fluorure, de la substance X, qui présente un caractère électronégatif. L'action d'autres formateurs de complexes, en particulier des thiols, du cyanure de potassium, sur des phosphatases acides reste mal connue.

Il est probable que les différences entre les phosphatases acides et alcalines ne résident ni dans la nature des coferments finalement responsables de la même catalyse enzymatique, ni dans celle des groupements métalliques participant probablement à la fixation du substrat sur l'enzyme. Elles devraient être recherchées plutôt dans les modes de liaison des métaux avec l'enzyme et dans la stabilité du complexe protéine-métal aux divers pH. Cette différence explique que l'inhibition concurrente (action du phosphate, de l'arséniate) est sensiblement constante alors que l'inactivation par des formateurs de complexes (fluorure, thiols, CNK) varie avec la nature de ceux-ci et avec le facteur qui conditionne principalement la formation des complexes : le pH du milieu.

B. — Activateurs.

Les recherches sur les activateurs des phosphatases sont favorables à la manière de voir que nous venons de développer ; elles avaient longtemps abouti à des résultats difficiles à interpréter du fait que les conditions optimales d'activation n'avaient pas été précisées.

1° *Conditions d'activation et de réactivation des phosphatases.*

a) *Etat de l'enzyme.* — Le degré « d'activabilité » d'un enzyme dépend d'abord de son état. Ainsi les extraits de poudres d'organes sont parfois plus sensibles à l'action de Mg^{++} que les macérations de tissus frais et celles-ci davantage que les autolysats [93], et par ailleurs l'activation par un métal est d'autant plus prononcée que la durée d'extraction d'un organe est plus

courte [160]. Des considérations analogues ont conduit Bamann à appliquer aux phosphatases la notion de lyo- et desmo- enzyme. Pour cet auteur, la sensibilité des phosphatases aux effecteurs est plus grande avec les lyoformes qu'avec les desmoformes. Cette différence ne résiderait pas seulement dans la présence de substances qui accompagnent l'enzyme mais surtout dans une disposition différente des groupements actifs sur les deux types d'enzymes ; les lyophosphatases possèderaient un état particulier d'activation dû à la situation privilégiée des groupements actifs sur le support colloïdal. Bamann explique ainsi que Mg^{++} active fortement l'hydrolyse des pyro et glycérophosphates par les extraits acétiques ou ammoniacaux des organes (lyophosphatases) tandis qu'il n'agit pas ou peu sur les résidus d'extraction (desmo- phosphatases). En outre les diverses fractions lyoenzymatiques des extraits acétiques possèdent des degrés de sensibilité différente aux effecteurs : la fraction la plus soluble est la plus activable [45, 46].

Cette conception qui a implicitement pour corollaire la renonciation à toute définition rigoureuse de la constante d'affinité, permet d'expliquer un grand nombre de contradictions relatives à l'action des cations sur les phosphatases. Pour les raisons que nous avons exposées plus haut (p. 28), il semble que des réserves s'imposent et qu'il est nécessaire de tenir compte, pour interpréter les faits qu'elle coordonne, de la présence des métaux inclus, non seulement dans le « ballaste » protéique qui accompagne l'enzyme, mais dans l'apophosphatase elle-même. C'est par exemple, la proportion des métaux en présence qui explique que Ca^{++}, cation essentiellement activateur, peut être en apparence inhibiteur [39, 45, 58]. C'est sans doute pour une raison identique que Mn^{++} est sans effet sur les préparations du type Albers considérées jusqu'à présent comme l'un des produits phosphatasiques les mieux purifiés et les plus actifs [7].

b) *Action synergique des effecteurs.* — L'action synergique des cations ne s'exerce pas toujours dans un sens défavorable à la catalyse enzymatique. Selon Cloetens, les phosphatases alcalines comportent deux métaux dont l'association dans des conditions bien définies favorise l'activité enzymatique. Ainsi la phosphatase Zn exigerait nécessairement la présence de ce métal et l'addition ultérieure de magnésium ne ferait qu'accroître son activité [97]. Une synergie d'action peut également exister entre un métal et un corps organique. Erdtmann a déjà, lors de la découverte des propriétés activatrices de Mg^{++}, noté que les produits de dialyse contenant le cation sont plus actifs que leurs cendres [131]. L'existence de coactivateur semble être confirmée par le

fait que certains acides aminés favorisent l'activation de la phosphatase alcaline par Zn. Les préparations d'intestin de rat dialysées sont inhibées par Zn et au contraire activées par le même cation en présence du dialysat de l'organe ou d'acides aminés. Le rôle de ces corps a été interprété comme celui de transporteurs de phosphate [207], ce qui est difficilement compréhensible.

En réalité le rôle des coactivateurs reste mal connu et insuffisamment étudié. La facilité avec laquelle les corps tels que les acides aminés forment des complexes avec les métaux conduit cependant à leur attribuer un rôle d'intermédiaire entre les cations et l'enzyme. Il y a là, sans doute, des éléments de recherches susceptibles d'ouvrir des horizons nouveaux à la chimie des phosphatases et d'autres enzymes.

c) *Durée de l'incubation au pH de stabilité.* — La fixation d'éléments électropositifs sur la protéine enzymatique suppose non seulement l'existence de liaisons par valences — valences principales des groupements CO, H, NH_2 liaisons résiduelles NH—CO COH — mais également des rapports de charges électriques. Ces possibilités, liées elles-mêmes à des phénomènes d'isomérisation, d'énolisation, de migration d'hydrogène, de cyclisation, de redistribution d'électrons, de remaniement des forces électrostatiques et des centres d'attraction d'ions, se modifient forcément sous l'apport des charges nouvelles dues à des variations du pH, à un afflux de cations. La faible vitesse de ces réactions explique la lenteur de la réactivation des phosphatases inactivées. Dans la réactivation de l'apophosphatase par le coenzyme séparé du support colloïdal dans le premier temps de l'expérience, elle nécessite un temps d'incubation de plusieurs heures (deux à dix) à 37° dans la zone où l'enzyme est stable [4, 5, 14]. La même nécessité apparaît lors de la réactivation de la phosphatase alcaline inactivée par dialyses prolongées contre des solutions d'oxalate, puis de CNK et enfin contre de l'eau distillée. L'enzyme ayant perdu 95 à 98 p. 100 de son activité recouvre celle-ci seulement après incubation au pH optimum d'hydrolyse à 37°. Les ions métalliques favorisent la « resynthèse » en dehors de l'action propre de l'enzyme. Par contre l'addition prématurée de substrat empêche la combinaison des composants enzymatiques [97].

En résumé, les conditions optima d'activation et de réactivation des phosphatases sont multiples. Elles exigent pour celles-ci un état de l'enzyme excluant à la fois l'intervention des « ballastes » protéiques et d'un excès de cations, l'action synergique de métaux et de coactivateurs et l'intervention de facteurs physiques assurant les réactions d'activation (pH, température, durée

d'incubation). La méconnaissance de ces conditions optima d'activation explique pourquoi les premières recherches sur l'activation des phosphatases n'ont fourni que des pourcentages d'activation médiocres et irréguliers et ont même conduit à attribuer une action défavorable à des activateurs aussi efficaces que Ca, Mn [7, 39, 45].

2° *Spécificité des activateurs connus.*

On peut, selon le degré d'efficacité des corps essayés, distinguer deux groupes d'activateurs : les uns encore mal connus sont constitués surtout par des produits de métabolisme, et leur activité apparaît comme faible et inconstante ; les autres constitués par un groupe de cations divalents, sont les puissants activateurs de l'hydrolyse phosphatasique.

On peut citer parmi les premiers des acides aminés : glycine, alanine [25, 76, 77, 94, 207] ; des stéroïdes tels que la corticostérone [156, 273], des vitamines [7, 110 158, 160, 240, 161, 359, 363, 416, 417]. Ils semblent agir seuls ou en synergie avec certains métaux [110, 159, 161] et de préférence sur les phosphatases alcalines. Le pourcentage d'activation obtenu dans les meilleures conditions ne dépasse pas 300 à 350 p. 100 et l'action parfois inhibitrice de certains de ces corps est probablement due au fait que les essais n'ont pas satisfait aux conditions d'activation précisées plus haut : les formateurs de complexes, en l'absence de cations avec lesquels ils peuvent fonctionner synergiquement comme activateurs, bloquent alors les groupements métalliques de l'enzyme et diminuent la vitesse de l'hydrolyse du substrat.

Pour les mêmes raisons, certains cations tels que Ca se montrent parfois inhibiteurs de phosphatases [45, 53, 58]. Néanmoins, il semble désormais acquis que de nombreux cations divalents : Ca, Mg, Fe, Mn, Ca, Ni, Hg sont activateurs des phosphatases alcalines. Cette action s'exerce indépendamment de l'origine biologique des préparations enzymatiques étudiées provenant de matériel végétal [bactéries [189, 349], levure [299]] aussi bien qu'animal [rein, 30, foie, os, sang 450, muscle [351]] et elle ne dépend pas de la nature du substrat : esters phosphoriques tels que glycérophosphate, phénylphosphate, pyrophosphate, polyphosphates, comme le montrèrent les résultats obtenus par Bamann et ses collaborateurs, que nous reproduisons dans le tableau suivant : [32, 37].

Substrat	Activation p. 100 par addition de					
	Mg	Mn	Fe	Co	Ni	Cd
β-glycérophosphate ..	8.807	24.974	4.452	918	196	inhibition
métaphosphate	160	1.500	810	1.810	40	200
pyrophosphate.....	3.990	0	685	1.950	0	0
polyphosphate.....	306	0	112	56	0	0

Les travaux de Cloetens [97], Massart et Dufait [297], sur les phosphomonoestérases « alcalines » démontrent également le caractère interchangeable des métaux. Pour Cloetens, en dehors d'une « mise en place » différente sur l'apoenzyme, Mg, Mn, Ca, Ni, Co, Zn et Hg se complètent mutuellement pour réactiver l'apophosphatase inhibée par dialyse contre des formateurs de complexes.

L'action des cations varie avec le pH du milieu. Si l'activation des phosphatases « alcalines » par les cations divalents est constante, celle des phosphatases « acides » (pH $< 5,6$) est imprécise). L'action du magnésium, la plus étudiée à cet égard, mérite d'être examinée. Ce métal, activateur constant de la phosphatase alcaline, se comporte certainement comme tel à pH = 5,6-6,4 vis-à-vis d'extraits de levure basse [58, 385, 386, 387] d'hématies [369, 370, 372] et peut être également vis-à-vis de certaines phosphatases végétales [43, 211]. A l'égard des phosphatases « acides » d'autres sources animales ou végétales, il se montre indifférent (rein [39, 435] foie [29]), urine, prostate, [272], salive, cerveau, soja [158, 162], pomme de terre [350], amande douce, moutarde [104], son de riz [315] ou légèrement inhibiteur (divers organes animaux [254], rate [114], os [282]). A pH = 4, Mg^{++} est fortement inhibiteur des phosphomonoestérases (levure haute [11]). Ces différences ne peuvent être imputées au degré de purification de l'enzyme lorsqu'on considère la forte activation par Mg de certaines phosphatases alcalines (24, 975 p. 100) et l'inhibition ou l'absence de réaction des phosphatases acides de degré de pureté au moins comparable [11, 269, 270, 271, 272]. Si elles se confirment, elles constitueront un fait capital dans l'étude de la spécificité et de la constitution des phosphatases.

L'état actuel des travaux permet difficilement de tirer à cet égard, une conclusion très ferme. L'étude des phosphatases « acides » reste trop fragmentaire et les essais d'activation de ces dernières ont rarement respecté les conditions optima d'expérimentation dont nous avons souligné plus haut la signification.

⁂

IV. — Spécificité et constitution des phosphatases.

Ces lacunes expliquent que, malgré les résultats acquis, nos connaissances sur la constitution des phosphatases présentent encore bien des contradictions.

H. Albers et ses collaborateurs [14], D. Albers [45], ont montré que la dialyse de la phosphatase « acide » de levure (pH optimum = 4) à pH > 6 et celle de la phosphatase « alcaline » de rein (pH optimum = 9) à pH < 5,6 permettent de dissocier les deux enzymes et fournissent, après concentration sous vide des eaux de dialyse, un produit (coferment) capable de réactiver (25 à 30 p. 100 de l'activité initiale) l'apophosphatase inactive (produit restant dans le sac de dialyse). Le coferment n'est pas constitué simplement par un métal, car Mg^{++} et divers cations seuls sont incapables de réactiver l'apoenzyme, et la diversité des apoenzymes déterminerait la spécificité des phosphatases à l'égard du pH et du substrat.

Par contre, des cations divalents : Mg, Mn, Ca, Co, Ni, Zn et Hg^{++} seuls ou associés deux à deux, sont capables de réactiver la phosphomonoestérase alcaline de rein (préparation du type Albers) qui a perdu 95 à 98 p. 100 de son activité par dialyse contre des formateurs de complexes (oxalate, cyanure), au cours de laquelle le coenzyme ne se dissocie pas : Cloetens [97].

De leur côté, Bamann et ses collaborateurs [28, 32, 37] ont montré que Mg, Mn, Fe, Co, Ni, Cd, activent à des degrés divers l'hydrolyse du β glycérophosphate, méta-pyro-, poly-phosphates en présence d'extraits ammoniacaux dialysés de foie de porc (pH optimum : 8,8) et le très fort pourcentage d'activation obtenu (24.974 p. 100) confère parfois à ces cations l'importance de véritables coferments.

Si les cations divalents sont les coferments des phosphatases « alcalines » leur inefficacité ou leur action inhibitrice sur les phosphatases « acides » cadre mal avec le caractère interchangeable des cophosphatases établi par Albers ; en outre elle explique difficilement que des enzymes de même spécificité de substrat admettent des groupements actifs différents. Cette dernière contradiction est d'autant plus flagrante que les gels de nombreux métaux sont capables d'hydrolyser les dérivés phosphoriques les plus divers : esters phosphoriques, acides pyro-poly-méta-phosphoriques [27, 36, 37] et que de multiples cations sont également capables d'activer les phosphomonoestérases, les pyro-poly- et méta-phosphatases.

L'ensemble de ces faits, joint aux conclusions tirées de l'étude des variations de spécificité en fonction du pH et du substrat, nous conduit à penser que les cations participent probablement à la fixation du substrat sur l'enzyme comme dans l'enolase, la zymohexase, l'anhydrase carbonique, la carboxylase, les peptidases. Ainsi s'expliquerait le caractère interchangeable des métaux, non seulement pour l'hydrolyse d'un substrat déterminé mais également pour celle des divers dérivés phosphoriques. Quant à la spécificité des phosphatases acides et alcalines et à leur comportement différent vis-à-vis des cations, ils s'expliqueraient par les différences qui président à la formation des complexes enzymatiques protéinométalliques. Les groupements (NH, CO_2H, etc...), servant dans la fixation des cations, étant différents dans les deux cas, ce qui va de pair avec les différences dans la dissociation des deux enzymes relevées par Albers, la nature, la concentration, les conditions optima de fixation des métaux varient d'un pH à un autre. Des traces très minimes de métaux, qui ne suffiraient pas à activer les phosphatases alcalines pourraient saturer les phosphatases « acides » et le complexe enzymatique actif en milieu acide pourrait présenter une stabilité différente de celle des complexes actifs en milieu alcalin. Les différences entre phosphatases acides et alcalines sont du même ordre de grandeur que celles rencontrées par Warburg et Christian dans le comportement des zymohexases de muscle et de levure vis-à-vis des cations [443].

Les acquisitions récentes de l'enzymologie ont montré la nature protéino-métallique de nombreux enzymes et mis en évidence la remarquable interchangeabilité des groupements prosthétiques de ces derniers. Le fait que les cations les plus divers participent à l'activité d'enzymes de fonction très différente, met en cause, à notre avis, la participation directe de ces métaux à la catalyse. La solution de ce problème est capitale pour l'étude du mécanisme de l'action enzymatique en particulier et de la catalyse en général.

DEUXIÈME PARTIE.

Recherches personnelles sur la chimie des phosphatases.

Objet des recherches et plan général du travail.

La solution de nombreux problèmes posés par l'étude des phosphatases exige que la spécificité et les caractères de ces enzymes, tant en ce qui concerne leurs substrats que leur pH optimum et leurs effecteurs, soient nettement définis. Les recherches qui font l'objet du présent travail ont été entreprises pour préciser ces critères. Elles résument les expériences que nous avons poursuivies en vue : 1°) de purifier et d'isoler des enzymes spécifiques ; 2°) de déterminer les conditions optima dans lesquelles les caractères de spécificité doivent être définis ; 3°) d'examiner le degré de généralité de ces dernières.

A). — L'emploi des diverses méthodes de purification et d'isolement nous a paru susceptible d'apporter des renseignements utiles sur la spécificité des phosphatases vis-à-vis de leur substrat. S'il permet de confirmer l'individualité des diverses phosphatases, il permettra aussi de définir le support matériel de cette spécificité et de préciser le rôle des deux constituants de l'enzyme dans son déterminisme. En effet, la dialyse dissocie différemment les coenzymes d'inégale stabilité en éliminant leurs groupements prosthétiques tandis que les méthodes d'adsorption ou de fractionnement par précipitation facilitent au contraire la différenciation des apoenzymes. La mise en jeu simultanée de diverses techniques doit dès lors être susceptible de nous renseigner sur l'importance respective du support colloïdal et des produits dialysables dans la conservation ou la destruction des diverses activités phosphatasiques.

Afin de simplifier les recherches, nous nous sommes limités à la comparaison des phosphomonestérases et des pyrophosphatases que nous avons essayé de séparer ou d'isoler et de définir par leurs principaux caractères.

B). — La signification des courbes d'activité phosphatasique en fonction du pH optimum d'action doit être établie afin de préciser dans quelle mesure elle constitue un caractère spécifique des phosphatases isodynames. Aussi avons-nous cherché

à expliquer les variations des pH optima que présentent diverses préparations enzymatiques.

Ces recherches nous ont conduit à examiner le problème de la stabilité des phosphatases en fonction du pH. Dans ce but, nous avons repris les travaux d'ALBERS et comparé la stabilité respective des phosphomonoestérases et des pyrophosphatases au cours de la dialyse aux divers pH. La dissociation de ces enzymes en apoferment et coferment permet de différencier d'une part les phosphomonoestérases et les pyrophosphatases et d'autre part les phosphatases « acides » et « alcalines ».

C). — La spécificité de ces enzymes doit être confirmée par l'action des effecteurs. La recherche des conditions optima dans lesquelles cette étude doit être entreprise nous a fait étudier à nouveau la notion de lyo et de desmo enzyme. Nous nous sommes efforcés de trouver une justification expérimentale aux réserves que nous avons formulées plus haut sur l'entière exactitude de cette conception et essayé de mettre en évidence l'importance des inhibiteurs naturels, en particulier celle des cations.

La recherche des conditions optima d'activation des phosphatases nous a conduit également à préciser le rôle des coactivateurs de ces enzymes. La connaissance des ces coactivateurs et de leur importance a précédé obligatoirement les essais d'activation des phosphatases.

Ceux-ci ont été réalisés à un triple point de vue : a) différenciation des phosphomonoestérases et des pyrophosphatases ; b) comparaison des phosphatases « acides » et « alcalines » ; c) définition du degré d'interchangeabilité des métaux.

Ces recherches devaient initialement préparer et faciliter l'étude de la constitution des phosphatases. En fait, elles ont permis d'examiner, à la lumière des faits apportés par la chimie des phosphatases, des problèmes d'enzymologie générale dont la solution est encore imprécise, tels que l'existence de lyo et desmoenzyme, le rôle des coactivateurs, l'interchangeabilité des groupements prosthétiques. A cet égard nos travaux dérivent directement des hypothèses émises dans les premiers chapitres de cet exposé.

CHAPITRE I.

SÉPARATION DES PHOSPHOMONOESTÉRASES ET DES PYROPHOSPHATASES. LEUR ISOLEMENT.

L'isolement des phosphomonoestérases et des pyrophosphatases constitue le principal critère de leur spécificité. Aussi s'est-on attaché de bonne heure à la préparation de ces enzymes purs par l'emploi des techniques les plus diverses.

Les méthodes d'adsorption ont été surtout utilisées par l'école japonaise. Elles sont basées sur le fait que selon la nature de l'adsorbant, la phosphomonoestérase et la pyrophosphatase sont fixées plus ou moins spécifiquement sur celui-ci. Le kaolin, en milieu phosphaté légèrement acide, adsorbe la pyrophosphatase des autolysats de reins dialysés ; la purification complétée par une élution au moyen de solutions de phosphate disodique, fournit une préparation hydrolysant le pyrophosphate et inactive sur le monophényl et diphénylphosphate [**315, 414**]. Au contraire $Mg(OH)_2$, en présence d'acétate de sodium, adsorbe la phosphomonoestérase et laisse en solution la pyrophosphatase [**267**]. D'autre part, les extraits de levure basse, agités plusieurs fois avec l'alumine C γ en milieu légèrement alcalin ne renferment plus que l'α-glycérophosphatase [**55**].

L'inactivation thermique permet la même séparation. Ainsi les extraits de levure basse traités par la chaleur perdent toute activité sur les esters phosphoriques, tandis qu'ils continuent à hydrolyser les pyrophosphates [**56**].

Enfin, Bamann a réussi la séparation des deux enzymes en se basant sur leur résistance différente à l'action simultanée des pH alcalins et de la température. Des extraits ammoniacaux de foie maintenus à pH = 9 et à 37° pendant 24 heures perdent toute activité monoestérasique et gardent leur pouvoir pyrophosphatasique [**29, 30, 40, 41**].

Les résultats obtenus par Bamann s'expliqueraient, comme ceux de Bauer, par une dénaturation sélective de l'apoenzyme. Mais cette interprétation n'a pas été vérifiée.

Les résultats des méthodes d'adsorption ne s'interprètent pas aisément non plus. Les caractères électrochimiques qui régissent l'adsorption ne semblent pas dépendre uniquement de la pyrophosphatase ou de la phosphomonoestérase, mais surtout de l'origine biologique des extraits enzymatiques. En milieu alcalin des adsorbants basiques (magnésie, alumine C γ) fixent tantôt la phosphomonoestérase, tantôt la pyrophosphatase.

En dépit de l'isolement des deux enzymes par adsorption, il est ainsi difficile de trouver une explication cohérente du mécanisme de leur séparation ; à plus forte raison, ne peut-on tirer des résultats obtenus une conclusion sur la nature des différences qui déterminent la spécificité de ces phosphatases.

⁂

I. — Méthodes d'adsorption.

Nous avons cependant appliqué ces dernières méthodes à l'étude d'un certain nombre de préparations enzymatiques, avec l'intention particulière d'établir des points de comparaison avec d'autres techniques. Leur efficacité a été spécialement essayée à la séparation d'enzymes qui n'ont, jusqu'à présent, fait l'objet d'aucune étude, dans certains tissus (phosphomonoestérases et pyrophosphatases des Basidiomycètes, pyrophosphatases des hématies).

A. — Basidiomycètes.

Les autolysats de champignons contiennent deux phosphomonoestérases (pH optimum : 3,6 - 4 et 5 - 5,6) (voir p. 92) et deux pyrophosphatases de pH optimum 3,8 - 4 et 5,8 - 6,4 (voir p. 95). La mise en évidence et la séparation des deux pyrophosphatases est possible par l'emploi de la technique d'adsorption.

1°) *Matériel d'étude et technique.*

Les extraits enzymatiques sont obtenus par macération d'une partie de champignons (*Lactaire délicieux*) et de cinq parties d'eau dans le cas du tissu frais et de vingt parties d'eau dans le cas du tissu sec. Après deux jours d'autolyse en présence de 1/10^{e} de volume de toluène on passe sur coton ou sur filtre. Le filtrat est dialysé à travers un sac de collodion contre de l'eau distillée, sous toluène, jusqu'à disparition de toute trace d'ions phosphoriques, ce qui demande en général deux à trois jours.

Le protocole d'hydrolyse est le suivant : dans des tubes jaugés de 20 cm³ on place 5 cm³ de la solution m/10 de β-glycérophosphate ou de pyrophosphate de sodium + 2 cm³ de solution tampon (citrate ou glycine m/10) + 1 cm³ de la solution enzymatique + 1 goutte de toluène. On ajuste au pH voulu, on complète à 20 cm³ avec de l'eau distillée et on porte à 37°. Le temps d'hydrolyse est variable suivant l'activité de l'enzyme.

La réaction est arrêtée par addition de 1 cm³ d'acide trichloracétique à 10 p. 100.

Le phosphore libéré est dosé par la méthode de Briggs-Robison. La présence de citrate pouvant affecter le développement de la couleur [287], les prises d'essai portent régulièrement sur la même quantité de liquide réactionnel.

2°) *Isolement des pyrophosphatases.*

Divers adsorbants ont été mis en œuvre pour la purification des enzymes. Le kaolin, l'oxyde de magnésium, le carbonate de magnésium, utilisés dans les conditions les plus diverses de concentration en ions H^+ et de température, adsorbent la presque totalité des pyrophosphatases. Le liquide séparé après adsorption n'est guère actif vis-à-vis des pyrophosphates et l'adsorbat, comme le produit de son élution, contient à la fois la pyrophosphatase et la phosphomonoestérase. Ceci étant, nous avons adopté une nouvelle technique d'adsorption.

On dissout dans 30 cm³ de dialysat de Lactaire, 4 grammes de $Cl\,NH_4$ et 6 cm³ d'acétate d'alumine. On précipite l'alumine en versant lentement 8 cm³ d'ammoniaque à 10 p. 100. Le pH du milieu atteint alors environ 6,0. Après repos d'une demi-heure, à la température ordinaire, on sépare le précipité par filtration ou centrifugation. Le liquide clair, additionné de quelques gouttes de toluène, est dialysé pendant vingt-quatre heures dans un sac de collodion contre de l'eau distillée. Au bout de ce temps, il apparaît quelquefois dans le liquide intérieur un léger trouble dû à une nouvelle précipitation d'alumine. Celle-ci peut être évitée en utilisant pour la précipitation 12 à 14 cm³ d'ammoniaque au lieu de la quantité indiquée plus haut. Le pH du milieu est alors de 6,5 à 7,0. La préparation ainsi obtenue est moins active. Par ailleurs le précipité d'alumine séparé, lavé deux fois à l'eau distillée, mis en suspension dans l'eau, sert également aux essais d'activité.

Enfin le même précipité, lavé est mis en suspension dans 30 cm³ de mélange tampon de phosphates alcalins de pH = 6,2 (m/10) pendant 1 heure à 30°. Après centrifugation, l'éluat

additionné de toluène est dialysé contre de l'eau distillée jusqu'à disparition totale des ions phosphoriques.

Les trois préparations enzymatiques fournissent les résultats rassemblés dans le tableau I.

TABLEAU I. — *Activité pyrophosphatasique et phosphomonoestérasique de l'extrait de Lactaire délicieux traité par adsorption.* — 5 cm³ de solution m/10 de pyrophosphate ou β-glycérophosphate de Na + 2 cm³ de solution tampon (citrate ou glycocolle Sörensen) + solution enzymatique + eau distillée q.s. 20 cm³. — 37°. — Chiffres en γ de P total libéré.

pH	Préparations									
	Liquides restés après adsorption Hydrolyse : 5 H.				Adsorbats lavés en suspension Hydrolyse 2 H.			Eluats dialysés Hydrolyse : 4 H.		
	Pyrophosphate Na				Pyrophosphate Na			Pyrophosphate Na		
	I	II	III	IV	Ia	IIa	IIIa	Ib	IIb	IIIb
3,6	100	240	115	240	910	830	930	790	630	770
3,8	135	250	135		**1590**	**1450**	**1650**	**1460**	**1180**	**1495**
4	**215**	310	**150**	**295**	1520	1400	1600	1400	1180	1480
4,6	160	**365**	115	280	1450	1370	1530	1340	1160	1330
5	100		125	212	1200	1100	1280	1050	950	1100
5,6	240	400	135	248	750	670	830	550	510	630
5,8				**260**						
6	**300**	500	135	232	510	480	590	300	310	380
6,4	160	**525**	**150**	200	400	420	510	270	250	300
7		395	115	172				214		
7,4		325	90					140		
	β-glycérophosphate Na				β-glycérophosphate Na			β-glycérophosphate		
3,6	indosable	indosable	indosable	indosable	1200	—	1800	900	700	—
5,6	»	»	»	»	4800	—	5650	3700	3800	—

Phosphomonoestérases et pyrophosphatases restent associées dans l'adsorbat comme dans l'éluat tandis que le liquide ayant subi l'adsorption, exempt de phosphomonoestérase, hydrolyse faiblement le pyrophosphate.

B. — HÉMATIES.

Les hématies renferment deux phosphomonoestérases « acides » (pH optimum : 4,1 et 5,4 - 5,8) et deux pyrophosphatases « acides » (pH optimum 4,1 et 5,4 - 5,8).

La séparation des deux enzymes est réalisée par adsorption sélective des pyrophosphatases.

1°) *Matériel d'étude et technique.*

Des hématies de bœuf fraîchement prélevées sont laquées à raison de deux parties d'eau distillée pour une partie de globules rouges.

L'hydrolyse est faite en présence de 2 cm³ de solution m/10 de glycérophosphate ou de pyrophosphate de sodium + 4 cm³ de solution tampon (acétoacétique ou véronal sodique) + 1 cm³ de solution enzymatique, pour un volume total de 10 cm³. L'hydrolyse se fait à 25° avec agitation mécanique modérée.

On déprotéinise au moyen de 5 cm³ d'acide trichloracétique à 10 p. 100 avant de procéder au dosage du phosphore.

2°) *Isolement des pyrophosphatases.*

90 cm³ de globules frais laqués sont amenés à pH = 5 par 3 cm³ d'acide acétique N et agités mécaniquement au contact de 5 grammes de kaolin lavé pendant 30 minutes à 25°. Après centrifugation et lavage de l'adsorbat à l'eau distillée, celui-ci est mis en suspension dans 30 cm³ d'eau et utilisé pour les essais d'activité.

Les résultats rapportés au tableau II montrent que dans les conditions expérimentales adoptées, le kaolin adsorbe sélectivement et entièrement les pyrophosphatases.

Tableau II. — *Activités β-glycérophosphatasiques et pyrophosphatasiques d'hématies laquées, avant et après adsorption sur du kaolin.* — 2 cm³ de solution m/10 de glycérophosphate ou de pyrophosphate de sodium + 4 cm³ de solution tampon (acétoacétique ou véronal sodique) + 1 cm³ solution enzymatique + eau distillée q.s. 10 cm³. Agitation continue pendant 6 heures à 25°. Chiffres en γ de P total libéré.

pH	β-Glycérophosphate de sodium		Pyrophosphate de sodium	
	Hémolysat	Adsorbat	Hémolysat	Adsorbat
3,8	68	trace	105	90
4,1	69	indosable	96	105
4,3	54	»	63	63
4,5	54	»	75	75
4,8	54	»	63	84
5,0	43	»	84	75
5,4	43	»	154	90
5,8	45	»	48	75
6,3	36	»	42	63

C. — Discussion des résultats.

Dans les hématies comme dans les Basidiomycètes nous avons pu ainsi séparer pour la première fois les phosphomonoestérases des pyrophosphatases. Les résultats obtenus semblent être cohérents en ce sens que les méthodes d'adsorption ont permis, avec des matériels biologiques nouveaux, de séparer et de mettre en évidence des activités phosphatasiques distinctes déjà décrites, à l'aide des méthodes similaires ou différentes, dans d'autres tissus. En outre, la séparation semble au premier abord caractériser des propriétés électrochimiques différentes dans les deux types d'enzymes, le kaolin, adsorbant acide, fixant la pyrophosphatase, et l'alumine, adsorbant basique, la phosphomonoestérase. En réalité dans ce dernier cas, la sélectivité reste faible et la majeure partie des pyrophosphatases est adsorbée en même temps que les phosphomonoestérases. Il est extrêmement difficile de trouver une explication satisfaisante à la séparation des deux enzymes dont les propriétés spécifiques ne peuvent être révélées par cette méthode d'isolement.

⁂

II. — Méthodes de dialyse au pH de dissociation des phosphatases.

En nous basant sur la dissociation de l'enzyme en ses constituants (Albers [4, 5, 9, 14]), nous avons pu élaborer une technique de séparation dont les résultats se prêtent davantage à une interprétation. H. Albers et ses collaborateurs, puis D. Albers, ont montré que la dialyse des phosphatases, à des pH en dehors des zones de stabilité, amène leur dissociation en apo- et coenzymes. Nous avons pensé que la destruction de l'un des enzymes et la conservation de l'autre doivent être possibles si les vitesses de dissociation des phosphomonoestérases et des pyrophosphatases sont différentes.

A. — Matériel d'étude et technique.

Des champignons secs (*Boletus edulis*, variétés diverses) ou de la poudre acétonique de foie de chien (1) sont broyés au mortier avec 30 parties d'acide acétique n/30. Au bout d'une

(1) Les poudres d'organes sont obtenues par broyage d'organes frais, traitement successif (trois fois) à l'acétone froide et sèche, et dessiccation sous vide phosphorique.

heure d'extraction on filtre, on centrifuge et on obtient la solution enzymatique.

Par ailleurs de la levure basse desséchée est broyée et mise à macérer avec vingt fois son poids d'acétone à 20 p. 100 + 1/10e du volume total d'un mélange à parties égales d'éther acétique et de toluène. Après six jours de macération, le liquide filtré est traité par de l'acétone jusqu'à concentration finale de 60 p. 100. Le précipité qui se dépose à la glacière est recueilli et lavé à l'acétone froide et sèche, desséché et conservé sous vide sulfurique (Produit du type Albers). La poudre obtenue sert à faire des solutions enzymatiques à 1 p. 100.

L'hydrolyse enzymatique s'opère à 37° dans les mêmes conditions que pour l'étude des hématies (p. 78).

B. — Séparation des pyrophosphatases.

1°) *Basidiomycètes.* — Les extraits de champignons sont dialysés dans des sacs de collodion, à 20°, contre de l'eau distillée (pH = 5,6) pendant trois jours jusqu'à disparition totale des ions PO_4^{---}. On poursuit ensuite la dialyse au moyen de solutions bicarbonatées (1/500) de pH = 9, en suivant quotidiennement la perte d'activité monoestérasique et pyrophosphatasique. Après deux semaines environ, la préparation se montre pratiquement inactive sur le β-glycérophosphate tandis qu'elle reste encore très active sur le sel minéral.

2°) *Levure basse.* — Les solutions enzymatiques faites avec le produit du type Albers sont soumises à la même dialyse que précédemment. D'une façon générale la destruction de la phosphomonoestérase se produit plus rapidement qu'avec les extraits de champignons (durée de dialyse : huit jours à dix jours).

3°) *Foie.* — Des extraits acétiques de foie ont été dialysés à pH = 2,5 pendant cinq jours et soumis aux mêmes essais d'activité que ci-dessus.

L'ensemble des résultats est rapporté au tableau III. Il montre que la dialyse à des pH situés en dehors des zones de stabilité des phosphatases entraîne à un plus ou moins bref délai une perte d'activité pratiquement totale de la phosphomonoestérase lorsque les préparations restent encore assez actives sur le pyrophosphate.

Tableau III. — *Activité pyrophosphatasique et phosphomonoestérasique de Basidiomycètes, de levure basse, de foie, après dialyse à pH = 9 ou 2,5.* — 2 cm³ de solution m/10 de pyrophosphate ou de β-glycérophosphate de Na + 4 cm³ tampon (acétoacétique ou véronal sodique) + 1 cm³ solution enzymatique. — En la présence ou en l'absence de Mg (10^{-3} M/l) + eau distillée q.s. 10 cm³. — 1 heure à 37°. — Chiffres en γ P total libéré.

pH	Préparations					
	Extraits Basidiomycètes		Extraits de levure basse		Extraits de foie	
	Pyrophosphate		Pyrophosphate		Pyrophosphate	
	0 Mg	Mg	0 Mg	Mg	0 Mg	Mg
3,6	625	625	800	**850**	635	635
4	**650**	**625**	**830**	830	635	**670**
4,6	625	570	640	640	**680**	635
5	600	570	640	640	570	650
5,6	585	535	595	690	605	625
6	570	550	570	595	675	580
6,4	585	570	555	550	570	590
7	585	570	575	575	**660**	670
6,4	**650**	570	725	850	570	**710**
8	625	**585**	**775**	**925**	570	680
	β-glycérophosphate		β-glycérophosphate		β-glycérophosphate	
3,6	indosable	indosable	indosable	indosable	indosable	indosable
5,6	»	»	»	»	»	»

C. — Discussion des résultats.

Le succès de cette méthode d'isolement des pyrophosphatases peut être interprété, en accord avec les travaux d'Albers, comme la conséquence d'une dissociation plus rapide des phosphomonoestérases que des pyrophosphatases. Cette dissociation se produit aussi bien à pH acide qu'à pH alcalin pourvu que ceux-ci se trouvent en dehors des zones de stabilité.

Sans préjuger de l'identité du coferment des deux enzymes on peut conclure que la liaison des deux constituants de l'enzyme est plus stable dans les pyrophosphatases que dans les phosphomonoestérases.

En outre la résistance des enzymes à la dissociation semble être liée à l'origine biologique des extraits, c'est-à-dire à la nature des protéines qui constituent le support colloïdal. En effet le temps de dialyse nécessaire à l'inactivation des phosphomono-

estérases, généralement très long dans le cas des Basidiomycètes, est plus bref avec les extraits de levure et plus encore avec les extraits de foie. Si ces différences ne proviennent pas des impuretés qui accompagnent l'enzyme et le protègent, elles impliquent la diversité des supports colloïdaux ; la spécificité enzymatique traduirait alors l'existence, non plus d'une espèce chimique définie, mais de groupements fractionnels doués d'une activité catalytique déterminée et communs à un certain nombre de supports colloïdaux. Les différences entre les zymohexases de la levure et du muscle indiquent également que le support matériel de la spécificité résiderait dans les dispositions de certaines fonctions chimiques particulières et non dans la constitution globale des protéines [419]. C'est ce qui explique que l'apoenzyme du ferment jaune de Warburg ne diffère guère des protéines ordinaires, dans sa composition [256].

⁂

III. — Fractionnement au moyen de solvants organiques. Cristallisation.

La précipitation fractionnée au moyen du sulfate d'ammonium a permis à Kutscher d'obtenir à partir des préparations de prostate et d'urine, des phosphomonoestérases « acides » (pH opt. : 5,5) particulièrement actives [270, 271, 272, 273]. Mais le pouvoir pyrophosphatasique de ces produits n'a pas été examiné. Nous avons tenté d'appliquer cette méthode dans la préparation de phosphatases pures, en utilisant la technique de Cohn, dont la mise au point faite par Derrien, Roche et leurs collaborateurs, permet l'isolement de fractions très pures de protéines sériques [371].

Le principe de la méthode consiste à repérer dans une courbe de précipitation en fonction des concentrations salines croissantes (SO_4Am_2) les points d'inflexion, sortes de points eutectiques, qui marquent le début et la fin de précipitation de deux fractions voisines. L'isolement et le fractionnement ultérieurs des portions comprises entre deux points d'inflexion, permet d'atteindre de proche en proche des protéines pures. L'application de cette méthode à la purification des phosphatases se heurte à une difficulté essentielle. En effet la présence de quantités très fortes de SO_4Am_2 qui inhibent l'enzyme, exige une dialyse préalable de diverses fractions soumises aux essais d'activité. Les risques de dissociation ou de dénaturation rendent

alors les mesures d'activité incertaines, incompatibles avec la finesse expérimentale exigée par la méthode (1).

Ceci explique l'échec des tentatives que nous avons réalisées dans ce sens sur des préparations rénales purifiées.

Nous avons alors eu recours à l'emploi de solvants organiques pour réaliser nos essais de purification.

A. — Matériel d'étude et technique.

Les préparations enzymatiques utilisées sont constituées par des extraits de reins (ou de muqueuse intestinale) de bœuf, obtenues selon la technique d'Albers [11, 12, 13] modifiée de la façon suivante : le rein broyé à la machine Latapie, et la muqueuse intestinale au mortier, sont réduits à l'état de pulpe. A chaque kilo d'organes hachés on ajoute un litre d'acétone à 25 p. 100 et 100 cm³ d'un mélange à parties égales de toluène et d'éther acétique. On laisse autolyser deux à trois jours à la température ordinaire en agitant la masse de temps à autre. On filtre. Le filtrat est mis dans un bain froid (— 8°) puis enrichi en acétone froide de manière que la concentration finale de celle-ci soit de 60 p. 100. Au bout d'une à trois heures, le précipité séparé par centrifugation est lavé deux ou trois fois à l'acétone froide exempte d'eau ; il est ensuite desséché sous vide sulfurique. Sous cette forme le produit peut conserver son activité pendant longtemps.

L'hydrolyse enzymatique s'opère dans des tubes jaugés à 10 cm³, en présence de 2 cm³ de solution m/10 de β-glycérophosphate ou de pyrophosphate de sodium + 4 cm³ de tampon véronal sodique + 0,1 cm³ de solution m/1 d'alanine + 0,1 cm³ de solution m/1 de SO_4Mg, 7 H_2O. On complète jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée. Le pH est de 8,6 pour l'hydrolyse du sel minéral et 9,2 pour celle de l'ester. On porte les tubes au thermostat et lorsque ces derniers atteignent la température de 37° on ajoute 0,1 à 0,5 cm³ de solution enzymatique. On complète à 10 cm³ avec de l'eau distillée. Au bout de cinq à quinze minutes on arrête la réaction au moyen d'une goutte d'acide SO_4H_2 à 30 p. 100 et on procède au dosage de P sans qu'il y ait lieu de déprotéiniser au préalable.

L'activité de la préparation s'exprime par la quantité de γ de P total libéré par minute par mg. d'azote. Les teneurs des préparations en azote sont appréciées par dosage, selon la tech-

(1) Le travail est déjà publié depuis plus d'un an lorsque nous parviennent les résultats obtenus par Bailey dans l'isolement d'une pyrophosphatase de levure de pH optimum = 7,2, particulièrement active. La méthode utilisée fait intervenir des fractionnements au sulfate d'ammonium. L'enzyme obtenu est inactif ; on le réactive par addition de magnésium [24].

nique Kjeldahl, des fractions de solutions enzymatiques utilisées.

B. — Isolement de la phosphomonoestérase « alcaline ».

La poudre rénale du type Albers, broyée au mortier avec cinquante parties d'eau distillée, fournit des solutions enzymatiques qui, après filtration, sont portées dans un bain réfrigérant (— 5 à — 8°). En agitant doucement on verse goutte à goutte de l'acétone glacée jusqu'à concentration finale de 38 p. 100 en solvant organique. Le pH du milieu est de 6,0 - 6,5. Après repos, le précipité est séparé par centrifugation. En maintenant la température au-dessous de 0° on enrichit le liquide surnageant en acétone pour atteindre finalement une concentration de 55 p. 100. On centrifuge entre trois mille et quatre mille tours de façon à avoir un culot de centrifugation de 0,5 cm. environ d'épaisseur. Le liquide une fois décanté, on laisse évaporer à l'air libre et à la température ordinaire, les traces d'acétone contenues dans le tube à centrifugation. Au bout d'une demi-heure à quelques heures, le précipité rentre à l'état de sol ; on le met alors à la glacière (4 - 5°). La solution, particulièrement rigide, laisse déposer en une nuit des cristaux en forme de plumeaux doués d'une très forte activité phosphomonoestérasique.

On peut répéter une ou deux fois, sur les solutions de cristaux, le fractionnement décrit ci-dessus. En général l'inactivation commence à se produire dès la quatrième opération et empêche de pousser plus loin la purification. Il arrive même, lorsque la cristallisation est lente, que cette dénaturation se produit après la première opération ; elle se traduit alors par une diminution de la solubilité et une réduction du pouvoir enzymatique.

Tableau IV. — *Activités phosphomonoestérasiques et pyrophosphatasiques de diverses préparations rénales purifiées.* — 2 cm^3 de solution m/10 de β-glycérophosphate ou de pyrophosphate de Na + 4 cm^3 de tampon véronal sodique + SO_4Mg = 10^{-3} m/l + 0,2 cm^3 d'enzyme + eau distillée q.s. 10 cm^3. 5.10^{-3} M/l est présente dans tous les essais réalisés avec des enzymes cristallisés. 5 minutes à 37°. — Chiffres en mg. de P total libéré par minute et par mg. de N.

Préparations	Phosphomonoestérase	Pyrophosphatase
Produits Albers	3,113	2,852
— 1re cristallisation	7,500	0,085
— 2e cristallisation	8,540	0,056
— 3e cristallisation	9,030	0,040

Dans le tableau IV, nous avons rassemblé les résultats qui permettent la comparaison d'activité de diverses préparations. La méthode de fractionnement et de cristallisation décrite, permet d'obtenir une phosphomonoestérase alcaline très active, pratiquement exempte de pyrophosphatase.

C. — Discussion des résultats.

Il ne semble pas que la disparition de l'activité pyrophosphatasique, au cours de la purification, provienne de l'élimination d'activateurs spécifiques naturels ou de coferments. En effet les préparations obtenues sont très actives sur les esters phosphoriques, même sans addition de Mg^{++} ou d'alanine, ce qui indique que la méthode de fractionnement n'amène pas une dissociation des coferments métalliques, comme dans la cristallisation de l'énolase ou de la zymohexase. Il est donc à présumer que l'isolement réalisé ne repose pas sur une dissociation des constituants de la pyrophosphatase mais sur la séparation d'impuretés protéiniques.

⁂

IV. — Spécificité des phosphomonoestérases et des pyrophosphatases.

L'existence de protéines enzymatiques différentes matérialise ainsi la spécificité des phosphomonoestérases et des pyrophosphatases. Il reste à savoir si la spécificité fine attribuée parfois à ces enzymes constitue une caractéristique réelle de ces derniers ou n'exprime qu'un effet secondaire dû à la présence d'activateurs spéciaux.

A. — Spécificité des phosphomonoestérases vis-a-vis des α et β-glycérophosphates.

L'action préférentielle marquée de certaines phosphomonoestérases pour l'α ou le β-glycérophosphate constitue l'un des aspects les plus délicats de la spécificité des phosphatases. Jusqu'à présent les variations de spécificité des phosphomonoestérases vis-à-vis des deux sels au cours de la purification ou selon l'origine biologique des extraits enzymatiques ont été interprétés soit par l'élimination d'activateurs particuliers, soit par l'altération des constantes d'affinité à la suite des modifications de l'apoenzyme. Nous avons voulu, en utilisant les préparations d'hématies et de Basidiomycètes, examiner dans quelle

mesure l'une ou l'autre de ces explications s'opposent ou se complètent.

1°) *Hématies.* — Des hémolysats de bœuf sont utilisés à l'état frais ou après six jours de conservation à la glacière (4 - 5°). Le protocole d'hydrolyse et de dosage est le même que celui décrit plus haut (p. 78), à cette modification près que l'incubation se fait à 37°. Les résultats objectivés par la figure 9 (p. 109) montrent que l'α-glycérophosphate est hydrolysé par les hémolysats frais, plus vite que le dérivé β, à tous les pH examinés, et non pas seulement aux pH = 5,6 - 6,4, considérés comme le pH optimum d'action d'une α-glycérophosphatase spécifique. D'autre part les différences de vitesses d'hydrolyse des deux sels deviennent insignifiantes lorsqu'on utilise de vieux hémolysats.

2°) *Basidiomycètes.* — Plusieurs échantillons de champignons frais ou secs (une partie) broyés et mis à macérer pendant trois heures dans trois à dix parties d'eau, fournissent, après filtration, une solution enzymatique qui est utilisée immédiatement. L'hydrolyse s'opère dans les mêmes conditions que ci-dessus. A intervalles de temps réguliers, on prélève 1 cm³ du liquide d'hydrolyse enzymatique et on le place dans des tubes contenant 2 cm³ d'acide trichloracétique à 10 p. 100. Le tableau V où sont rassemblés les résultats montre que la vitesse d'hydrolyse des glycérophosphates à pH = 3,2 varie d'une préparation à une autre : tantôt le dérivé α, tantôt son isomère sont hydrolysés le plus rapidement.

TABLEAU V. — *Hydrolyse comparée des α et β-glycérophosphates de Na à pH = 3,2 par divers extraits de Basidiomycètes.* — 2 cm³ de solution m/10 d'α ou de β-glycérophosphate de Na + 4 cm³ tampon acétoacétique + 1 cm³ solution enzymatique + eau distillée q.s. 10 cm³. — 37°. — Chiffres en γ de P total libéré.

Temps (minutes)	Glycérophosphates							
	α				β			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
30	550	300	480	530	550	280	430	550
60	820	600	700	800	940	550	570	950
90	1050	950	990	1100	1270	720	810	1410

3°) *Discussion des résultats.* — Nos expériences confirment le fait que l'hydrolyse préférentielle de l'α ou du β-glycérophosphate n'est pas liée à un pH donné et qu'elle n'est pas le fait d'une phosphatase spécifique. Les variations observées sur les

extraits de Basidiomycètes dont la préparation, toujours la même, ne semble apporter aucune cause d'inactivation et d'altération de l'enzyme, laissent prévoir l'existence d'un constituant enzymatique capable de modifier les vitesses d'hydrolyse des deux sels. La présence de ce corps, susceptible également d'expliquer les modifications, est sans doute la cause des variations survenues au cours de certains traitements. D'autre part, la labilité et la différence de répartition du produit rendent compte des changements observés au cours de la conservation (hématies) ou selon la nature des tissus examinés.

B. — Spécificité des pyrophosphatases vis-a-vis des pyrophosphates minéraux et organiques.

L'hydrolyse des pyrophosphates organiques a été attribuée soit à l'action d'une pyrophosphatase particulière, différente de l'enzyme responsable de la scission du pyrophosphate minéral, soit à la présence d'un activateur spécifique [267]. L'action synergique d'une pyrophosphatase et d'une phosphomonoestérase a été envisagée [326], mais elle n'a fait jusqu'ici l'objet d'aucune confirmation expérimentale.

Tableau VI. — *Hydrolyse comparée, par l'extrait de Lactaire dialysé, du pyrophosphate et du diphénylpyrophosphate, en la présence ou en l'absence de Mg 10^{-2} M/l.* — 2 cm³ solution m/10 de pyrophosphate de Na ou de diphénylpyrophosphate de K + 4 cm³ tampon acétoacétique + 1 cm³ solution enzymatique + eau distillée q.s. 10 cm³. pH = 4 et 5,6. En la présence ou en l'absence de $MgSO_4$ 10^{-2} M/l. — 1 h. à 37°.

pH	Pyrophosphate Na			Diphénylpyrophosphate K		
	p. 100 hydrolyse		p. 100 inhibition	p. 100 hydrolyse		p. 100 inhibition
	0 Mg.	Mg.		Mg.	0 Mg.	
4	12	8,5	3,5	50	2	48
5,6	7,7	7,2	0,5	31	28	3

Il nous a été possible, en utilisant l'action inhibitrice différente du magnésium sur les phosphomonoestérases « acides » et les pyrophosphatases « acides » de mettre en évidence l'action combinée de ces deux sortes d'enzyme dans l'hydrolyse du diphénylpyrophosphate. En effet le magnésium, à la concentration de 10^{-2} m/litre, exerce sur l'hydrolyse du β-glycérophosphate de sodium par l'extrait de Lactaire dialysé, une inhibition de plus en plus intense à mesure qu'on passe de pH = 5,6 à

pH = 4,0 ; elle réduit alors de 60 p. 100 l'activité initiale. Nous avons comparé l'hydrolyse, à divers pH, du pyrophosphate de sodium et du diphénylpyrophosphate (1), en présence d'ions Mg (10^{-2} m/l) au moyen de l'extrait de lactaire dialysé. Les résultats obtenus ont été rassemblés dans le tableau VI.

L'examen de ces données montre que si l'hydrolyse du pyrophosphate minéral est plus fortement inhibée à pH = 4,0 (pH optimum d'hydrolyse de la pyrophosphatase) qu'à pH = 5,6 (pH optimum de la monoestérase), celle de l'ester arylique l'est énergiquement à pH = 4,0 ; la perte d'activité relative est alors presque la même que celle observée dans le cas de l'hydrolyse du glycérophosphate sodique. En présence de Mg^{++}, l'hydrolyse du diphénylphosphate est plus importante au pH optimum d'action de la phosphomonoestérase (5,6) qu'à celui de la pyrophosphatase (4,0). La vitesse de l'hydrolyse du diphénylpyrophosphate est donc réglée par celle de l'action de la monoestérase sur l'ester orthophosphorique libéré au cours de la première phase de la réaction.

CONCLUSIONS.

1°. — La spécificité des phosphomonoestérases et des pyrophosphatases correspond à l'existence d'enzymes particuliers. Il est possible, par fractionnement au moyen de l'acétone et cristallisation, d'isoler une phosphomonoestérase très active et exempte de pouvoir pyrophosphatasique, et par ailleurs Bailey a récemment isolé une pyrophosphatase spécifique.

Cependant l'activité phosphomonoestérasique et pyrophosphatasique ne paraît pas nécessairement liée à l'existence d'apoenzymes protéiques de types divers ; elle caractériserait plutôt les dispositions fonctionnelles des groupements chimiques communs à divers supports colloïdaux. Ceci explique la résistance différente des phosphomonoestérases de diverses sources biologiques à la dissociation à des pH en dehors des zones de stabilité de ces enzymes. Les différences entre phosphomonoestérases et pyrophosphatases résident également dans le degré de cohésion des deux constituants enzymatiques, les premiers enzymes se dissociant plus rapidement que les seconds.

2°. — La spécificité des phosphomonoestérases et des pyrophosphatases démontre l'influence prépondérante du reste phosphorique du substrat et le rôle effacé du reste alcoolique sous l'action phosphatasique. Ainsi l'hydrolyse du diphénylpyrophos-

(1) Le diphénylpyrophosphate de potassium est synthétisé suivant les indications de Neuberg et Wagner [322].

phate n'est-elle pas due à la présence d'activateurs d'enzymes spécifiques mais à l'action synergique d'une pyrophosphatase et d'une phosphomonoestérase. D'autre part les préférences des phosphomonoestérases vis-à-vis de l'un des isomères de l'acide glycérophosphorique ne semblent pas résulter de l'action d'enzymes spécifiques, mais de celle d'activateurs dont la présence serait susceptible de modifier les constantes d'affinité des phosphomonoestérases vis-à-vis de l'un ou de l'autre des glycérophosphates. La solution complète de ce dernier problème, qui constituera une précieuse acquisition pour la compréhension des mécanismes de la spécificité des phosphatases, pourrait être recherchée avec fruit dans la comparaison des processus d'hydrolyse et de synthèse enzymatique. Il est remarquable que la phosphomonoestérase alcaline et la phosphomonoestérase peu acide de l'émulsine (pH = 5,6), considérées comme β-glycérophosphatases dans leur action hydrolysante, donnent toujours naissance à l'isomère α lors de la phosphorylation du glycérol [**104, 151**]. En admettant que le glycérophosphate formé ne se libère de l'enzyme qu'une fois la synthèse achevée, il est certain que les deux configurations moléculaires de l'ester glycérophosphorique s'adaptent très bien à un même enzyme. Il doit donc exister un facteur extérieur à la phosphatase elle-même qui favorise l'hydrolyse de l'un des isomères ; sa mise en évidence sera utile à la fois pour expliquer les différences d'hydrolyse des glycérophosphates et pour comprendre les mécanismes de la phosphorylation et de la déphosphorylation.

CHAPITRE II.

LE pH ET LES PHOSPHATASES.

L'individualité des phosphatases « acides » ou « alcalines » isodynames est liée à la constance du pH optimum d'action qui les caractérise. Elle est souvent altérée par les nombreuses variations du pH optimum se manifestant selon l'origine biologique des enzymes ou leur mode de préparation. L'absence, fréquemment observée, de certains pH optima dans des types déterminés d'extraits a même conduit à l'hypothèse d'une certaine spécificité des systèmes phosphatasiques de divers tissus. Ainsi Albers a-t-il cru pouvoir relier l'absence des phosphatases « très acides » et « alcalines » chez les végétaux verts à la nature particulière des protéines de ces organismes, et d'une façon générale, au métabolisme de ces derniers [10].

Un certain nombre de ces variations de pH optimum s'expliquent par l'influence d'effecteurs, en particulier de la « substance X » de l'*Aspergillus Oryzae*. L'existence d'inhibiteurs naturels pouvant modifier les caractères enzymatiques des extraits d'autres tissus, nous avons étudié systématiquement les variations de pH optimum des phosphatases d'un certain nombre de tissus au cours de la purification de leurs extraits. Les différences observées peuvent aussi être dues à la destruction partielle d'un ou plusieurs enzymes qui coexistent dans la même préparation ; elles peuvent encore résulter de la libération, grâce à l'autolyse, d'activateurs exaltant préférentiellement l'un des types de phosphatases. Nous avons étudié divers systèmes phosphatasiques naturels en tenant compte de ces multiples facteurs. L'ensemble des recherches exposées dans ce chapitre a pour but de dégager la signification générale des courbes d'activité phosphatasique en fonction du pH.

Cependant l'interprétation complète des pH optima d'action des phosphatases et de leur diversité ne pourra être donnée que si l'on parvient à relier l'influence des ions H à la constitution de ces enzymes. Les phosphatases sont des ampholytes actifs seulement à l'état indissocié (Inouye, Kohayashi, Kutscher,

Albers). Bamann, le premier, en alternant les traitements à l'acide acétique n/30 et à l'ammoniaque n/30 a réussi des inactivations spécifiques et obtenu des préparations actives uniquement en milieu acide ou alcalin. Ces résultats ont été interprétés à la lumière des travaux d'Albers, selon lesquels il existe une dissociation des phosphatases « acides » au-dessus de pH = 6 et des phosphatases « alcalines » à pH < 5,6. Toutefois la réactivation obtenue par Albers, après dissociation de l'enzyme est faible ; en outre ses résultats sont en contradiction avec ceux de Kutscher montrant qu'une phosphatase « acide » purifiée particulièrement active ne se dissocierait pas. Ces faits nous ont amené à reprendre les travaux d'Albers, en utilisant soit le matériel biologique déjà employé par cet auteur, soit un matériel différent.

⁂

I. — Les pH optima des phosphatases. Leurs variations.

Signification générale des courbes d'activité en fonction du pH.

Nous avons examiné successivement les extraits des champignons (Basidiomycètes), des végétaux verts (graines de soja et d'amande douce), d'hématies, d'organes animaux (foie, rein, intestin). Nous déterminons les conditions dans lesquelles apparaissent ou disparaissent certains pH optima d'action et nous essayons de coordonner les variations observées par une explication générale des faits.

A. — Basidiomycètes.

1°) *Mise en évidence des phosphatases isodynames.*

a) *Phosphomonoestérases.* — Le matériel d'étude et les protocoles d'hydrolyse et de dosage sont dans l'ensemble les mêmes que ceux décrits antérieurement (p. 76). Dans le but de respecter l'équilibre $E + S \rightleftarrows ES$, nous avons eu soin de maintenir constantes les concentrations respectives en substrat et en enzyme. L'influence du pH sur l'affinité de l'enzyme pour le substrat est ainsi soustraite aux variations expérimentales dans la mesure où elle dépend du rapport des concentrations de ces corps. Les préparations obtenues à partir de divers champignons (*Agaricus, Armillaria mellea, Laccaria laccata, Lactarius deliciosa, Lactarius subdulcis, Pholiota*) présentent toutes vis-à-vis

des glycérophosphates comme du méthylphosphate de sodium, un pH optimum d'hydrolyse de 5,0 à 5,6. Les Basidiomycètes semblent, comme il est généralement admis pour les plantes

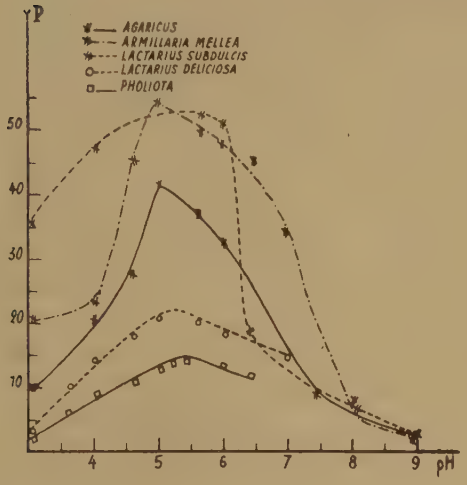


FIGURE 1. — *Variations de l'activité phosphomonoestérasique des extraits de divers Basidiomycètes* (Agaricus, Armillaria mellea, Lactarius deliciosa, Lactarius subdulcis, Pholiota) *sur le β glycérophosphate de sodium en fonction du pH.*

Abscisses : pH.

Ordonnées : γ de phosphore libérés par minute.

vertes, dépourvues de toute autre phosphomonoestérase isodyname, en particulier de la phosphatase « très acide » dont la présence est régulière dans les champignons inférieurs : moi-

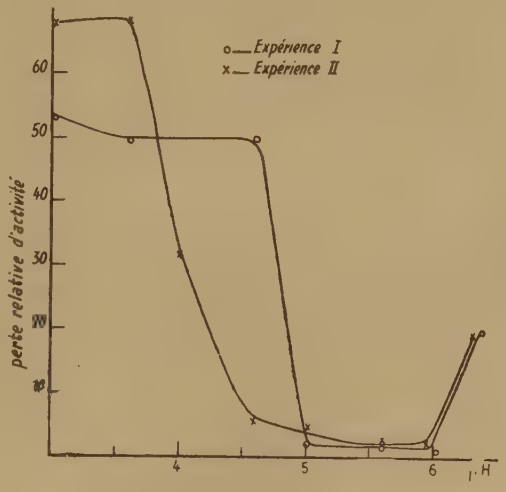


FIGURE 2. — *Perte d'activité de la phosphomonoestérase de l'extrait de Lactaire délicieux à divers pH et à Mg = 10^{-2} M/l.*

Abscisses : pH.

Ordonnées : pourcentage de perte d'activité relative.

sissures, levure. Cependant l'action de Mg^{++} sur les extraits dialysés de Basidiomycètes varie avec les divers pH. On observe en effet que la présence de SO_4Mg, 7 H_2O (1.10^{-2} M/l) détermine une perte d'activité de 2 p. 100 au pH optimum (5 à 5,6) et de 60 p. 100 et plus dans la zone de forte acidité.

L'observation précédente peut être expliquée en admettant que l'ion Mg^{++} modifie aux pH bas la dissociation d'un enzyme unique, dissociation dont dépend l'activité. On peut aussi penser que Mg^{++} exerce des effets divers sur plusieurs monoestérases coexistant dans les préparations. Cette seconde hypothèse se confirme au cours de nos essais de purification.

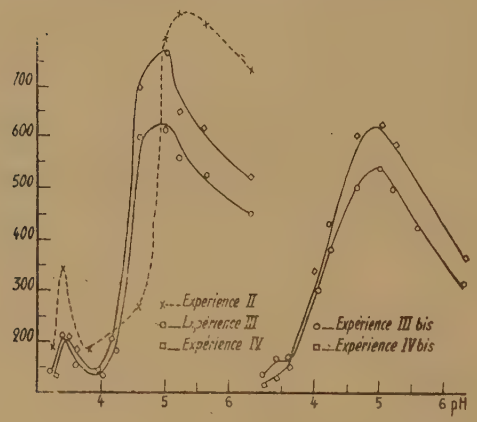


FIGURE 3. — *Activité phosphomonoestérasique vis-à-vis du β glycérophosphate de sodium, à divers pH, de l'extrait de Lactaire délicieux, purifié par adsorption sur kaolin et élution.*

Abscisses : pH.

Ordonnées : γ de phosphore libérés en 24 heures à 37°.

L'adsorption a été faite en ajoutant à 20 cm³ de préparation enzymatique dialysée 1 g. de kaolin lavé et 20 cm³ d'acide acétique N/5. On abandonne une heure à 30° en agitant fréquemment. Après centrifugation le liquide surnageant est dialysé dans un sac de collodion contre de l'eau distillée. Le culot de centrifugation est lavé deux fois à l'eau distillée, puis mis en suspension pendant une heure à 30° dans 30 cm³ d'un mélange tampon de phosphate de pH = 6,8. Après centrifugation, l'éluat est dialysé contre de l'eau distillée jusqu'à disparition de la majeure partie des phosphates ; il est alors prêt pour l'hydrolyse

TABLEAU VII. — *Activité phosphomonoestérasique en fonction du pH d'extraits de Lactaire délicieux avant et après adsorption sur kaolin.* — 5 cm³ de solution m/10 de β-glycérophosphate de Na + 2 cm³ de solution tampon (citrate ou glycocolle Sörensen) + solution enzymatique + eau distillée q.s. 20 cm³. — 24 heures à 37°. — Chiffres en γ de P total libérés.

Essais N°	pH										
	3,2	3,4	3,6	3,8	4	4,2	4,6	5	5,2	5,6	6,4
I	180	250	200	160	—	—	180	320	430	800	380
II	140	340	—	180	—	—	270	790	840	820	730
III	140	210	160	—	140	180	600	620	550	530	450
III *bis*	140	160	160	—	300	380	500	540	500	430	320
IV	140	210	180	—	140	210	700	760	650	620	500
IV *bis*	120	140	150	—	340	430	600	620	580	—	360

enzymatique. Celle-ci a été opérée dans les conditions habituelles mais, la préparation étant peu active, la durée de la réaction a été de vingt-quatre heures. Les résultats obtenus ont été rassemblés dans le tableau VII complété par la figure 3.

Dans les expériences II bis et IV bis, on a ajouté au même mélange réactionnel que dans les expériences III et IV, 4 cm³ de l'extrait initial séparé après adsorption.

L'examen du tableau VII et de la figure 3 montre que l'adsorption sur kaolin et l'élution de l'adsorbat au moyen d'une solution phosphatée à pH = 6,8 fournissent une solution enzymatique beaucoup moins active que le produit primitif, mais *révélant l'existence d'une phosphatase de pH optimum égal à 3,4.* Le point singulier situé toujours plus bas que le maximum correspondant au pH = 5,6 peut être supprimé par addition à l'éluat du liquide séparé après adsorption. *La phosphatase acide est donc accompagnée d'un inhibiteur naturel, non dialysable.*

L'adsorption sur alumine telle qu'elle a été décrite plus haut (p. 76) permet également de mettre en évidence la phosphomonoestérase très acide. Le précipité d'alumine lavé deux fois à l'eau distillée et mis en suspension dans l'eau distillée, constitue une préparation phosphatasique à deux pH optima : à 3,6 et à 5.

Tableau VIII. — *Activité phosphomonoestérasique en fonction du pH d'extraits de Lactaire délicieux, après adsorption sur alumine.* — 5 cm³ de solution m/10 de α ou de β-glycérophosphate de Na + 2 cm³ de solution tampon (citrate ou glycocolle Sörensen) + solution enzymatique + eau distillée q.s. 20 cm³. — 1 h. 30 et 2 h. 30 à 37°. — Chiffres en γ de P total libérés.

pH	1 heure 30		2 heures 30	
	β	α	β	α
3	70	—	80	—
3,2	90	240	100	320
3,4	90	470	180	730
3,6	285	—	500	—
3,8	135	—	180	—
4	160	440	250	500
4,2	635	300	1.110	320
4,6	900	—	1.600	—
5	915	800	1.650	1.350
6,4	600	425	1.050	680

b) *Pyrophosphatases.* — Les extraits de *Lactarius deliciosus* dialysés deux jours agissant sur le pyrophosphate de sodium

et le diphénylpyrophosphate de potassium présentent un pH optimum d'hydrolyse voisin de 4.

La mise en évidence d'une deuxième pyrophosphatase a pu être faite après purification. Nous avons adopté la méthode d'adsorption sur alumine décrite plus haut. Le liquide résiduel de l'adsorption agissant sur le pyrophosphate de sodium, dans les conditions ordinaires, présente deux pH optima = 3,8 - 4,0 et 5,8 - 6,4. Dans certaines préparations suffisamment actives la séparation des deux pyrophosphates isodynames est complète et l'isolement de la deuxième phosphatase possible (courbe II, figure 5).

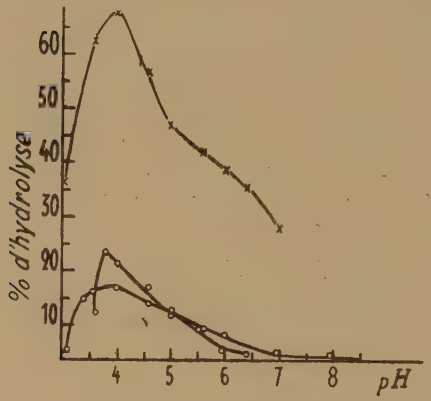


FIGURE 4. — *Variations de l'activité pyrophosphatasique des extraits de Lactaire délicieux sur le pyrophosphate de sodium* (o——o ; durée de l'hydrolyse : 1 h.) *et sur le diphénylpyrophosphate de potassium* (x——x ; durée de l'hydrolyse : 3 h.), *en fonction du pH.*

Abscisses : pH.

Ordonnées : p. 100 de substrat hydrolysé.

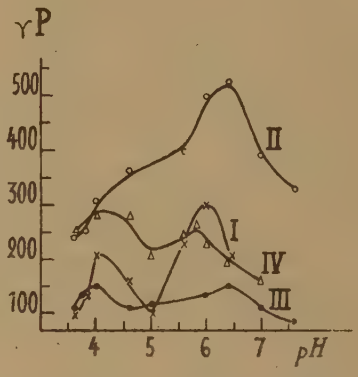


FIGURE 5. — *Activité pyrophosphatasique, à divers pH, de l'extrait de Lactaire délicieux séparé après adsorption sur alumine.*

Abscisses : pH.

Ordonnées : γ de phosphore libérés en 5 heures à 37°.

L'activité de la pyrophosphatase de pH optimum égal à 6,0 est masquée dans l'extrait brut par un inhibiteur naturel non dialysable qui peut être séparé par adsorption. Cet inhibiteur est étroitement associé à l'enzyme car les précipitations successives d'alumine faites par la technique indiquée ci-dessus dans l'extrait de Lactaire ne l'entraînent que très difficilement. Nous avons étudié l'élimination de cet inhibiteur de la façon suivante. L'alumine, précipitée d'abord par 4 cm³ d'AmOH à 10 p. 100 est abandonnée une demi-heure à la température ordinaire avant d'être séparée par centrifugation. Le liquide surnageant, traité par 1 cm³ d'AmOH, est abandonné pendant une

heure à 37°. On sépare le précipité et on traite le liquide par 3 cm³ d'AmOH à 37° pendant trois heures. Le liquide, séparé du nouveau précipité, est soumis à la dialyse. Seul le dialysat, peu actif, révèle l'existence de deux pyrophosphates ; les trois précipités successifs d'alumine, avant ou après élution, ne se montrent guère actifs qu'à pH = 4,0.

Ainsi, à côté de la pyrophosphatase de pH optimum égal à 4, les Basidiomycètes contiennent un deuxième enzyme de pH optimum égal à 5,8 - 6,4, qui est étroitement lié à un inhibiteur naturel.

2°) *Caractères et stabilité des préparations enzymatiques des Basidiomycètes.*

a) *Fréquence de l'inhibition.* — Nous avons cherché à savoir si une extraction uniforme et ménagée de divers tissus amène des différences dans les préparations enzymatiques. Dans ce but des champignons de diverses espèces sont broyés au fur et à mesure de la récolte et mis à macérer pendant trois heures dans de l'eau chloroformée, dans la proportion d'une partie de produit et de trois parties de liquide et utilisés immédiatement.

L'hydrolyse enzymatique et le dosage s'opèrent dans les conditions décrites à la page 76. Les extraits ne présentant qu'un seul pH optimum d'hydrolyse sont soumis à la purification par adsorption sur kaolin ou sur alumine, suivant les protocoles déjà exposés. L'éluat dans le cas des monoestérases, ou le liquide séparé après adsorption dans celui des pyrophosphatases, présente constamment deux pH optima d'hydrolyse.

Tableau IX. — *Fréquence de l'inhibition des phosphatases.*

Espèces	Nombre d'échantillons examinés	Nombre de cas où il existe une inhibition totale			
		Monoestérases		Pyrophosphatases	
		pH=3,2 3,6	pH=5 5,6	pH=3,6 4	pH=5,6 6,4
Armillaria mellea....	5	3	0	0	5
Clytocybe	3	4	0	0	3
Laccaria laccaria ...	6	4	0	0	6
Lactarius deliciosus..	8	6	0	0	8
Scleroderma.....	1	1	0	0	1
Tricholoma.....	3	2	0	0	3

L'examen du tableau IX montre que si la monoestérase de pH optimum = 5 - 5,6 et la pyrophosphatase de pH optimum = 4 sont activées dans la préparation brute, l'autre pyrophos-

phatase y est constamment inhibée. En ce qui concerne la monoestérase « acide » la fréquence de l'inhibition est variable, mais toujours grande. L'irrégularité des époques des récoltes ne nous a pas permis d'établir une relation entre la présence de l'inhibiteur et la taille des champignons. De même la nature des organes (pied, chapeau, lamelles) n'intervient pas.

b) *Influence de l'autolyse et du vieillissement sur la stabilité des monoestérases.* — Des champignons de diverses espèces (*Armillaria mellea, Clytocybes, Laccaria laccata, Lactarius deliciosus*) ont été traités de trois façons :

Préparation A. — Les champignons frais ou secs (une partie) sont broyés et mis à macérer pendant trois heures dans trois ou dix parties d'eau, en présence de quelques gouttes de chloroforme. La filtration fournit une solution enzymatique qui est utilisée immédiatement (Am), conservée (Am C) ou dialysée à travers un sac de collodion contre de l'eau distillée jusqu'à disparition de toute trace de phosphore (trois jours). La liqueur dialysée est utilisée sur le champ (Ad) ou seulement après une dizaine de jours de conservation (Ad C).

Préparation B. — Une macération de trois jours est faite en présence de 1/10e du volume total de toluène (B) ou en présence de quelques gouttes de $CHCl_3$ (B bis). Le produit est utilisé directement (Bm) ou après dialyse (Bd).

Préparation C. — L'autolyse de trois jours est réalisée en présence de toluène (1/20e du volume total) et d'éther acétique (1/15e) comme dans la technique préconisée par Albers. Elle fournit trois catégories de produits utilisés, soit avant (Cm), soit après dialyse (Cd) ou seulement après deux mois de conservation (Cdc).

TABLEAU X. — *Variation des pH optimum d'activité phosphomonoestérasique d'extraits de champignons selon le degré d'autoylse et de vieillissement.* — 2 cm³ de solution m/10 de β-glycérophosphate de Na + 4 cm³ de solution tampon (acétoacétique ou véronal sodique) + 1 cm³ d'extrait de champignon + eau distillée q.s. 10 cm³. pH de 3,2 à 6,4. — 1 heure à 37°. — Chiffres en γ de P dosé (1 cm³).

pH	Préparation de type A											Préparation de type B				Préparation de type C		
	N° 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	Armillaria m.				*Clytocybe*		*Laccaria l.*			*Lactarius d.*		*Laccaria l.*		*Lactarius*		*Armillaria m.*		
—	Am —	Amc —	Ad —	Adc —	Am —	Ad —	Am —	Ad —	Adc —	Am —	Ad —	Bbis —	Bm —	Bd —	Bm —	Cm —	Cd —	Cdc —
3,2	123	120	79	**36**	48	35	120	97	85	45	20	62	88	46	30	**76**	**60**	**41**
3,6	135	130	82	27	66	**47**	**134**	**127**	98	68	25	75	103	48	45	65	52	38
4	**138**	**134**	**85**	25	**69**	45	130	123	105	**85**	27	88	120	51	52	60	50	35
4,6	130	124	82	38	65	43	124	145	116	55	38	100	123	52	58	68	52	30
5	123	**130**	**87**	53	63	**47**	**134**	**158**	130	68	45	**103**	**127**	63	60	**73**	**61**	**44**
5,6	109	116	75	**97**	58	42	116	154	**136**	**97**	**55**	98	120	**65**	**62**	50	56	42
6	103	**110**	66	79	53	37	**110**	**138**	120	94	50	90	112	58	56	48	44	30
6,4	88	96	42	73	43	25	96	87	79	88	36	63	87	56	47	45	27	25

Les résultats, obtenus après hydrolyse enzymatique et rassemblés dans le tableau X, justifient les observations suivantes :

1) une extraction aqueuse de courte durée ne permet pas de mettre régulièrement en évidence le pH optimum d'hydrolyse à 5 - 5,6 du β-glycérophosphate de sodium (expériences n°s 1 et 5). La conservation le fait au contraire apparaître (essais 2 et 6).

2) l'autolyse prolongée révèle toujours ce pH optimum.

3) la macération prolongée, en l'absence (essai 12) ou en la présence (essais 13 et 15) de toluène, fait disparaître systématiquement le pH optimum d'hydrolyse de la zone 3,2 - 4. Le vieillissement peut parfois produire le même effet (essais 9 et 11) ; il tend dans d'autres cas à déplacer ce pH optimum vers une plus grande acidité (essais 4 et 6).

4) l'extraction en présence d'éther acétique stabilise les deux pH optima (essais 16, 17 et 18) que le vieillissement ne fait plus alors disparaître.

c) *Influence de l'autolyse et du vieillissement sur les pyrophosphatases.* — Aux trois types de préparations qui nous ont servi à étudier les monoestérases et qui permettent d'examiner également les pyrophosphatases, nous en avons ajouté une quatrième obtenue par extraction au glycérol à 80 p. 100, ce qui évite toute autolyse. Les champignons desséchés sont broyés avec vingt fois leur poids de glycérol à 80 p. 100 et abandonnés pendant trois jours. L'extrait obtenu, de teinte jaune paille moins foncée que celle des préparations aqueuses, est dialysé pour éliminer le glycérol. Aucune des préparations brutes employées ne révèle l'existence de deux pyrophosphatases isodynames. Un seul pH optimum égal à 3,6 - 4 se manifeste avant purification. Par contre les produits séparés par adsorption à l'alumine présentent deux pH optima d'hydrolyse se trouvant respectivement à 3,6 - 4 et à 6.

3°) *Discussion des résultats.*

L'existence d'un ou de plusieurs pH optima observée avec les diverses préparations phosphatasiques ne correspond pas toujours à l'absence d'un enzyme défini lorsque l'optimum correspondant fait défaut. Les caractères des solutions enzymatiques dépendent en particulier des méthodes d'extraction et de conservation. La présence des tissus traités, le degré d'autolyse, les solvants utilisés conditionnent la libération des inhibiteurs naturels dont la solution en même temps que celle de l'enzyme

peut provoquer l'inhibition d'une ou de plusieurs phosphatases. La disparition d'un pH optimum peut être imputée à la fragilité d'un enzyme isodyname, ou bien due à un processus d'inhibition évoluant au cours de la préparation et du vieillissement de la solution, s'ajoutant à la destruction spontanée de l'enzyme. L'adsorption sur kaolin dans la préparation du type B ou dans la préparation du type A vieillies et qui ne présentent plus d'optimum à pH = 3,2 permet de retrouver ce dernier après élimination de l'inhibiteur. On peut donc admettre que l'action des protéases se poursuivant dans la solution enzymatique, certains des produits de l'hydrolyse inactivent la monoestérase intéressée. Ce qui explique d'une part que le processus d'inhibition est plus complet lorsque le liquide de macération est soumis à un contact prolongé avec les tissus traités et subit une protéolyse plus énergique et d'autre part, que l'éther acétique, intervenant dans la préparation du type C et gênant la solubilisation de certaines molécules protéiques, possède une action stabilisatrice réellement efficace. Des préparations de ce type, datant de soixante jours, renferment encore de la monoestérase « acide » (expérience 18 du tableau X).

On comprend aussi qu'un mécanisme d'inactivation naturelle peut régler l'activité de ce derniers enzyme dans les organismes vivants. Une protéolyse plus ou moins poussée, en relation avec le degré de croissance, peut en effet libérer des produits capables d'inhiber les phosphatases et expliquer aussi que des champignons de même espèce, traités d'une façon uniforme, soient les uns actifs, les autres inactifs à pH = 3,2 (tableau X). Enfin l'apparition tardive d'une phosphatase de pH optimum 5,0 - 5,6 observée avec le liquide de macération après séparation du tissu traité (essais 12 et 19 du tableau X) et la stabilisation du pH optimum d'hydrolyse à 5,6 par vieillissement des préparations autres que celles du type C (tableau X) pourraient provenir d'une part des modifications de l'enzyme même et d'autre part de la destruction d'un inhibiteur naturel [2, 11]. Quoi qu'il en soit, les produits de la protéolyse ou de l'autolyse des Basidiomycètes semblent capables, soit d'inhiber l'une des phosphatases (pyrophosphatase et monoestérase), soit de modifier le pH optimum d'hydrolyse de ces enzymes. La courbe d'activité phosphatasique des préparations non parfaitement purifiées en fonction du pH ne traduit donc pas seulement la présence ou l'absence d'enzymes mais également celle d'effecteurs de l'action enzymatique.

B. — Végétaux verts.

1°) *Le système phosphomonoestérasique des graines de soja. Inhibition des préparations brutes de soja.*

Les graines de soja sont mises à gonfler dans l'eau pendant une nuit puis émondées et broyées avec 5 parties d'eau. La macération s'opère en présence de toluène pendant trois jours. Le liquide jaune obtenu après filtration est amené à pH = 4 - 4,5 par l'acide acétique glacial puis centrifugé au bout de cinq à dix minutes. L'extrait obtenu, très limpide est dialysé aussitôt contre de l'eau distillée. La dialyse, poursuivie en renouvelant très fréquemment l'eau dans laquelle plonge le sac, est parfois suivie d'une électrodialyse (20 - 40 mA), mais ceci n'amène guère de changement. Après vingt-quatre heures de dialyse, on procède à l'hydrolyse enzymatique, en la présence ou en l'absence de Mg. Les résultats sont rapportés dans le tableau XI (préparation A).

L'optimum d'action se situe à pH = 5,6 comme l'ont établi Kay et Lee, Giri [158, 233]. A ce pH l'enzyme est pratiquement insensible à l'ion Mg. Mais, fait nouveau le magnésium exerce une inhibition croissante sur l'enzyme à mesure qu'on descend l'échelle des pH. L'action inégale de Mg aux divers pH et dont l'interprétation nous a conduit à la mise en évidence de la phosphomonoestérase « très acide » dans les Basidiomycètes, laisse prévoir l'existence de ce même enzyme dans les graines de soja.

Isolement des deux phosphatases isodynames. — Les graines de soja sont traitées comme précédemment mais l'extraction dure trois heures et la dialyse dix-huit. L'adsorption se fait à pH = 4,5 à l'aide de 90 cm^3 de dialysat et de cinq grammes de kaolin lavé. Après une heure trente d'agitation continue on centrifuge. Le liquide surnageant est dialysé une nuit (préparation B du tableau XI). Le culot de centrifugation lavé deux fois à l'eau distillée est élué à l'aide de 30 cm^3 de phosphate monopotassique M/10 à pH = 6,2 et à 37°. Au bout d'une heure l'éluat séparé par centrifugation est dialysé dix-huit heures (préparation B bis du tableau XI). Les résultats obtenus après hydrolyse enzymatique sont consignés dans le tableau XI. Le pH optimum demeure fixé à 5,6 sauf dans la préparation B où il semble se déplacer vers 5 (Tableau XI).

Nous avons ensuite procédé à des essais d'adsorption sur alumine. L'extraction des graines de soja est faite à l'aide de l'acide acétique m/30 et dure une demi-heure. Le liquide blanc

TABLEAU XI. — *Activité phosphomonoestérasique de diverses préparations de soja en fonction du pH.* - - 2 cm³ de solution de β-glycérophosphate de sodium M/10 + tampon acétoacétique ou véronal sodique + solution enzymatique (1 cm³ pour la préparation A et 2 cm³ pour les autres). Volume total 10 cm³. A 37°. 1 heure (A, B, B bis), 2 heures (C bis) ou 8 heures (C), en la présence ou en l'absence de SO_4Mg 10^{-2} M. Chiffres en γ de P total libéré.

pH	Préparation A			Préparation B			Préparation B *bis*			Préparation C			Préparation C *bis*		
	0 Mg	10^{-2} M Mg	perte activité p. 100	0 Mg	10^{-2} M Mg	perte activité p. 100	0 Mg	10^{-2} M Mg	perte activité p. 100	0 Mg	10^{-2} M Mg	perte activité p. 100	0 Mg	10^{-2} M Mg	perte activité p. 100
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3,6	528	306	—42	99	42	—57	306	198	—35	561	210	—62	330	149	—54
3,8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	616	407	—33	440	253	—42
4	612	404	—27	111	84	—24	390	276	—30	660	451	—31	440	308	—30
4,3	672	588	—12	138	111	—19	390	336	—14	715	561	—21	512	484	— 5
4,6	726	672	— 7	153	130	—15	420	360	—14	616	561	— 9	539	539	0
4,8	—	—	—	153	130	—15	420	360	—14	—	—	—	—	—	—
5	1140	1116	— 2	210	180	—14	588	528	—14	561	561	0	561	561	0
5,6	1230	1200	— 2	195	168	—14	612	588	— 3	308	308	0	644	644	0
6,2	558	558	— 3	99	90	— 9	336	321	— 4	90	90	0	308	308	0

laiteux obtenu après filtration est amené à pH = 4,5 par l'acide acétique glacial pour être débarassé de la majeure partie de ses protéines. Le liquide filtré est aussitôt soumis à l'adsorption. A 40 cm³ de dialysat on ajoute 5 grammes de $ClNH_4$ et 8 cm³ d'acétate d'alumine. On y verse très lentement de l'AmOH à 10 p. 100 pour ramener le pH à 6,5 - 7. Après une demi-heure d'abandon à 20 - 25°, on centrifuge. Le liquide surnageant est dialysé dix-huit heures (préparation C). L'adsorbat lavé deux fois à l'eau distillée est élué avec 30 cm³ de solution de PO_4H_2K à pH = 6,2 pendant une heure à 37°. Après centrifugation l'éluat est dialysé dix-huit heures (préparation C bis du tableau XI).

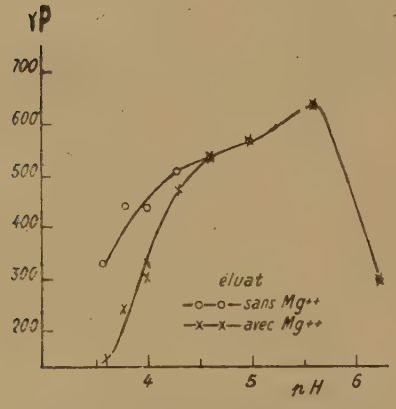


FIGURE 6.— *Activité phosphomonoestérasique des préparations de soja, en fonction du pH, après adsorption sur alumine et élution.* Hydrolyse 2 h. à 37°.
Abscisses : pH.
Ordonnées : γ de P total libéré.

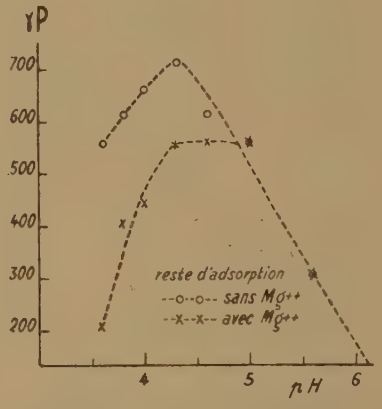


FIGURE 7. — *Activité phosphomonoestérasique des préparations de soja, en fonction du pH, après traitement à l'alumine.* Hydrolyse 8 h. à 37°.
Abscisses : pH.
Ordonnées : γ de P total libéré.

Les chiffres du tableau XI et les figures 6 et 7 montrent la présence, dans le liquide ayant subi l'adsorption, d'un enzyme actif à pH = 4,3. L'éluat qui présente un optimum d'action à pH = 5,6 n'est pas entièrement débarassé de la phosphatase « très acide » puisqu'il accuse encore une grande sensibilité à l'ion Mg^{++}. De même il est probable que le liquide ayant subi l'adsorption contient encore l'autre monoestérase et que le pH optimum = 4,3 traduit un reste d'activité de celle-ci, superposé à l'activité propre de l'enzyme « très acide ». La labilité de la phosphatase « très acide », laquelle est accrue par l'acidité du milieu et la durée de l'hydrolyse à 37° nous amène à supposer que le véritable pH optimum d'action de cet enzyme se trouve

à une acidité plus forte à laquelle la sensibilité de Mg est maximum.

2°) *Le système phosphatasique des graines d'amandes douces.*

Pour cette étude nous avons préparé diverses émulsines d'amandes fraîches ou sèches. Nous avons également utilisé une émulsine commerciale très ancienne que nous avons purifiée par dissolution dans l'eau distillée, traitement à l'acide acétique glacial (pH = 4,5) et précipitation à l'éthanol. Au moment de l'emploi l'émulsine est dissoute dans l'eau distillée, dialysée vingt-quatre heures puis centrifugée pour être débarassée des parties insolubles. L'hydrolyse comparée à pH = 3,6 et 5,6 montre que Mg^{++} et Ca^{++} sont légèrement inhibiteurs à pH = 5,6 et nettement activateurs à pH = 3,6. L'émulsine commerciale ne devient activable qu'après purification et l'activation observée n'est pas due à un décalage de pH optimum comme le montre le tableau XII.

Tableau XII. — *Influence de Mg sur l'activité phosphomonoestérasique des émulsines vis-à-vis des α et β-glycérophosphates de Na à pH = 3,6 et 5,6.* — 2 cm³ de solution m/10 de glycérophosphate de Na (α ou β) + 4 cm³ tampon acétoacétique + 1 cm³ solution enzymatique + eau distillée q.s. 10 cm³ ; en la présence ou en l'absence de $MgSO_4$ 10^{-2} M. 1 heure à 37°. Chiffres en γ de P total libéré.

Emulsine	Glycérophosphates	pH = 3,6			pH = 5,6		
		0 Mg	10^{-2} M Mg	perte (—) ou gain (+) d'activité p. 100	0 Mg	10^{-2} M Mg	perte (—) ou gain (+) d'activité p. 100
I ...	α	198	282	+ 42	642	642	0
	β	198	282	+ 42	840	780	— 7
II ...	α	174	240	+ 40	558	558	0
	β	174	240	+ 40	696	642	— 8
III ...	α	168	222	+ 31	580	580	0
	β	168	234	+ 39	720	670	— 7
IV ...	α	126	168	+ 33	390	390	0
	β	126	180	+ 39	480	444	— 7
V ...	α	195	195	0	390	390	0
	β	195	195	0	390	390	0
VI ...	α	222	279	+ 25	390	360	— 7
	β	222	279	+ 25	444	390	—10

Les gains et pertes d'activité calculés d'après le tableau XII et objectivés dans la figure 8, traduisent d'une façon très nette le comportement inverse de l'émulsine de part et d'autre des pH = 4,3 - 4,5. Ceci serait-il l'indice de la présence de deux phosphatases isodynames de caractères différents ?

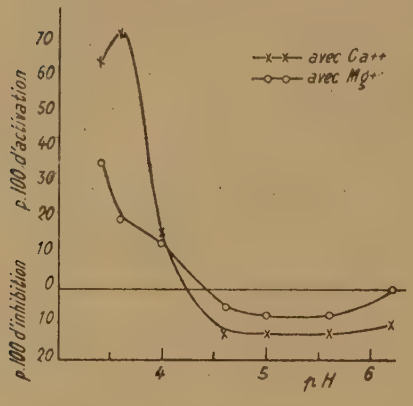


FIGURE 8. — *Pourcentage d'activation et d'inhibition de l'action phosphomonoestérasique de l'émulsine, en fonction du pH.*
Abscisses : pH.
Ordonnées : p. 100 d'activation ou d'inhibition.

L'adsorption sur alumine des extraits frais d'amandes sèches (extraction une demi-heure à l'acide acétique n/30) ne donne pas ici les résultats escomptés (Tableau XIII).

Le pH optimum reste fixé à 5,6 et après adsorption le liquide ne semble guère s'enrichir en l'une ou l'autre des deux phosphatases (essai B). L'adsorption sur kaolin, telle qu'elle a été décrite plus haut donne de meilleurs résultats. Si l'éluat dialysé conserve les caractères des préparations brutes, le liquide séparé après adsorption marque un certain déplacement du pH optimum d'action

TABLEAU XIII. — *Activité phosphomonoestérasique de diverses préparations d'amande douce en fonction du pH.* — 2 cm³ solution m/10 de β-glycérophosphate de Na + 4 cm³ tampon acétoacétique ou véronal sodique + 2 cm³ solution enzymatique + eau distillée q.s. 10 cm³. En la présence ou en l'absence de SO_4Mg 10^{-2} M/l. 37°. Durée 1 heure pour *1* et *3* et 8 heures pour 2 et 4. Chiffres en γ de P total libéré.

pH	Essai A		Essai B		Essai C			
	1. Reste d'adsorption		2. Reste d'adsorption		3. Eluat		4. Reste d'adsorption	
	0 Mg	10^{-2} M Mg	0 Mg	10^{-2} M Mg	0 Mg	10^{-2} M Mg	0 Mg	10^{-2} M Mg
3,6	56	70	152	528	360	444	336	534
3,8	60	75						
4	69	89	444	642	642	696	588	696
4,3	97	93	672	716	1005	978	756	756
4,6	116	107	726	726	1146	1116	810	810
4,8	—	—	756	756	1230	1176	840	840
5	125	112	840	820	1254	1200	810	780
5,6	149	139	840	820	1314	1278	810	780
6,2	51	51	—	—	—	—	—	—

(essai C). En tous cas, après adsorption et en présence de Mg^{++} ou de Ca^{++}, les vitesses d'hydrolyse aux pH = 3,6 et 5,6 tendent à s'égaliser. Si le pourcentage d'hydrolyse à pH = 5,6 est pris comme référence avec la valeur de 100, il est égal à 30 à pH = 3,0 avant purification et à 70 après adsorption et en présence de Ca. La position du pH = 4,8 est intermédiaire. Ce déplacement du pH optimum d'action, joint à des différences d'activation aux diverses acidités, nous amène à penser que l'émulsine renferme, à côté de la phosphatase de pH optimum = 5,6, une autre de caractères différents.

Effectivement la mise en évidence des phosphatases « très acides » dans les graines d'amandes douces est possible avec les préparations du type Albers. Des graines d'amandes, émondées, broyées, soumises à l'autolyse selon la technique d'Albers, fournissent après fractionnement à l'acétone (50 p. 100) une poudre blanche entièrement soluble dans l'eau. La solution enzymatique soumise à la dialyse à 37° pendant deux-trois jours présente un pH optimum phosphomonoestérasique = 3,6 et deux pH optima pyrophosphatasiques à 4 et à 5.

Tableau XIV. — *Activité phosphomonoestérasique et pyrophosphatasique de préparation purifiée d'amande douce en fonction du pH.* — Hydrolyse : 2 cm³ solution m/10 de β-glycérophosphate ou de pyrophosphate de sodium + 4 cm³ tampon acéto-acétique + 1 cm³ d'enzyme + eau bidistillée q.s. 10 cm³. 37°. 1 heure. Chiffres en γ de P total libéré.

pH	Glycérophosphate	Pyrophosphate
3,6	155	124
4,0	107	222
4,6	103	155
5,0	75	283
5,6	61	155
6,0	35	170

3°) *Discussion des résultats.*

L'ensemble des faits observés montre que le système phosphomonoestérasique « acide » du soja et des amandes est constitué par deux enzymes isodynames dont le « plus acide » est souvent accompagné d'inhibiteurs naturels séparables par adsorption, comme dans le cas des Basidiomycètes. L'absence d'un pH optimum dans les préparations brutes est souvent due à la présence d'effecteurs naturels et non à l'absence de la phosphatase elle-même. L'hydrolyse comparée en présence d'effec-

teurs tels que Mg et Ca dont l'action est différente sur les divers types d'enzymes isodynames permet de mettre en évidence des pH optimum qui n'apparaissent pas au premier examen des courbes d'activité en fonction du pH obtenues avec des préparations impures. De légères variations de pH optimum peuvent provenir, à la limite d'action de plusieurs phosphatases, de l'action synergique d'enzymes partiellement inactivés et d'enzymes agissant à des pH éloignés de leur pH optimum.

C. — Hématies.

1°) *Système phosphomonoestérasique « acide ».*

Nous avons établi suivant les protocoles d'hydrolyse et de dosage décrits plus haut (p. 79) les courbes de l'activité d'hématies laquées fraîches ou vieillies sur les glycérophosphates de sodium à divers pH. Les résultats obtenus (Tableau XV et figure 9) traduisent l'existence de deux pH optima phosphomonoestérasiques très voisins, respectivement égaux à pH = 4,8 et 5,4 dans la plupart des hémolysats.

Tableau XV. — *Activité β-glycérophosphatasique des hématies laquées en fonction du pH.* — 2 cm³ de solution m/10 β-glycérophosphate de Na + 4 cm³ de solution tampon acétoacétique ou au véronal sodique + 1 cm³ d'hémolysat (hématies 1 + eau distillée 2) + eau distillée q.s. 10 cm³. 6 heures à 37°. Chiffres en γ de P total libéré.

pH	Hématies de Rat		Hématies de Bœuf				
	I	II	III	IV	V	VI	VII
3,8	174	105	254	55	35	42	74
4,1	174	105	**279**	84	90	56	180
4,3	225	105	235	—	118	96	210
4,5	258	126	223	181	153	128	252
4,8	**342**	**159**	174	**230**	**174**	**147**	**267**
5,1	273	126	**216**	217	132	105	180
5,2	348	138	—	—	132	120	204
5,4	357	**147**	210	**229**	**139**	**147**	**204**
5,8	**369**	120	—	202	90	98	154
9,2	195	84	153	174	48	21	126

Cependant certains de ceux-ci particulièrement actifs (III) présentent un optimum à pH = 4,1 et non à pH = 4,8. On peut dès lors penser que cette dernière valeur reflète la destruction progressive d'un enzyme à optimum d'action plus acide, l'optimum à 4,8 étant la résultante de deux actions enzymatiques dont l'une forte aurait son maximum à pH = 5,8, l'autre faible

à pH = 4,1 environ. Cette manière de voir est confirmée par les résultats obtenus sur les mêmes hématies dans diverses conditions de temps et de température que l'on trouve reportées dans le tableau XVI.

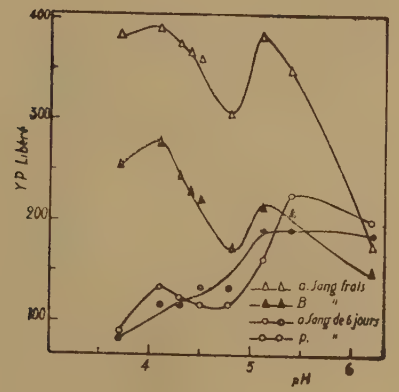


FIGURE 9. — *Action d'hémolysats de Bœuf frais ou conservés six jours à + 2° sur l'α- et le β-glycérophosphate de sodium à divers pH.*

Abscisses : pH.
Ordonnées : γ P libéré.

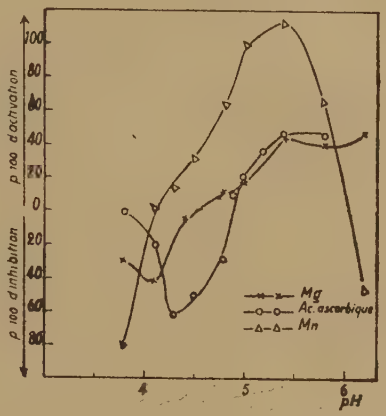


FIGURE 10. — *Action des ions Mg^{++} (10^{-1} M) et Mn^{++} (10^{-2} M) et de l'acide ascorbique (1,5.10^{-3} m sur l'hydrolyse du β-glycérophosphate de sodium par les hématies laquées de Bœuf.*

Abscisses : pH.
Ordonnées : pourcentage d'activation ou d'inhibition.

TABLEAU XVI. — *Action du temps et de température sur le dédoublement du β-glycérophosphate de sodium par les hématies laquées (Bœuf).* — 2 cm³ de solution m/10 de β-glycérophosphate de Na + 4 cm³ de solution tampon acétoacétique ou au véronal sodique + 1 cm³ d'hémolysat frais + eau distillée q.s. 10 cm³. Chiffres en γ de P total libéré.

pH	37°		6 heures		
	6 heures	20 heures	25°		37°
4,1	132	138	**63**	**69**	63
4,3	153	168	54	**54**	75
4,4	**187**	168	54	54	96
4,5	139	264	**63**	54	**120**
4,8	**166**	294	42	42	69
5,1	153	**405**	42	42	75
5,4	139	384	42	42	54
6,2	111	168	42	36	54

L'hydrolyse comparée aux divers pH, en l'absence ou en la présence de Mg, Mn, acide ascorbique, permet également de mettre en évidence la présence de deux pH optima distincts :

les pourcentages d'activation et d'inhibition objectivés dans la figure 10 constituent de véritables courbes d'activité en fonction du pH ; l'activation maximum à pH voisin de 5,5 et la plus forte inhibition à pH voisin de 4 sont particulièrement caractéristiques.

2°) *Système pyrophosphatasique « acide ».*

Les hématies fraîches, étudiées dans les conditions adoptées pour l'étude des phosphomonoestérases, présentent trois pH optima d'hydrolyse respectivement égaux à 3,8 - 4,1, 4,8 et 5,4 - 5,8. Le premier de ceux-ci correspond à une pyrophosphatase « très acide », le troisième à un autre enzyme de même type tandis que le second est un artefact dû à la simultanéité de l'action de ces pyrophosphatases. En effet, la présence de Mg^{++} activant fortement l'un des enzymes (pH = 5,4 - 5,8) mais non l'autre (pH = 3,8 - 4,1) fait disparaître cet optimum intermédiaire, que les hématies soient fraîches ou aient été conservées quatre jours à + 2°. Les globules rouges renferment donc deux pyrophosphatases « acides » de pH optima 3,8 - 4,1 et 5,4 - 5,8.

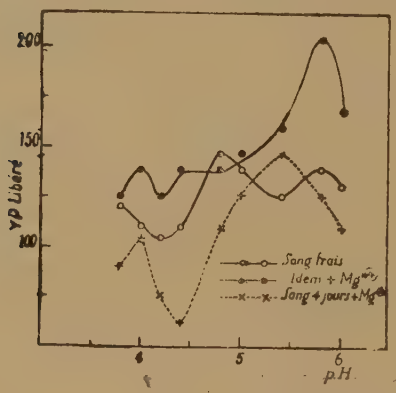


FIGURE 11. — *Activité pyrophosphatasique des hématies laquées fraîches ou conservées 4 jours à + 2° (Bœuf) à divers pH en présence ou en l'absence de SO_4 Mg 5.10⁻³ M.*

Abscisses : pH.
Ordonnées : γ P libéré.

3°) *Discussion des résultats.*

L'étude des préparations de champignons, de soja et d'amandes, montre que l'absence d'un pH optimum particulier sur les courbes d'activité phosphatasique en fonction du pH ne traduit pas nécessairement l'absence de l'enzyme correspondant dans l'extrait étudié. Inversement les essais poursuivis sur les hématies nous enseignent que l'apparition sur des courbes analogues de pH optima aberrants ne reflète pas forcément la présence de phosphatases nouvelles. Les déterminations d'activité sont souvent altérées par des artefacts résultant de l'action synergique à un pH déterminé de deux enzymes. L'élimination des artefacts s'obtient d'abord par le choix des conditions de temps et de température d'hydrolyse qui évitent une destruction iné-

gale des enzymes présents. Elle s'obtient aussi par l'intervention des effecteurs agissant différemment sur des phosphatases dont les activités très différentes à un pH donné mettent en valeur les pH optima recherchés.

D. — Organes animaux : foie, rein, intestin.

L'utilisation des actions inégales de certains effecteurs sur plusieurs phosphatases est très utile pour la mise en évidence de leurs pH optima d'action. Ainsi les extraits hépatiques obtenus par traitement des organes frais à l'eau distillée pendant une heure ne présentent qu'une activité minime sur les pyrophosphatases aux pH supérieurs à 6 ; au contraire dans les extraits obtenus par autolyse de l'organe (quarante-huit heures et plus à + 5°), on ne décèle qu'un pH optimum d'action à 5,5. En faisant agir sur les mêmes extraits hépatiques le couple cystéine-Fe$_{II}$ (1) on décèle avec une très grande netteté l'existence simultanée de trois pyrophosphatases (figure 12). L'intervention des effecteurs choisis permet ainsi, dans une certaine mesure, de compenser les effets de solubilisation et d'altération de certaines phosphatases dont la présence risquerait de passer inaperçue.

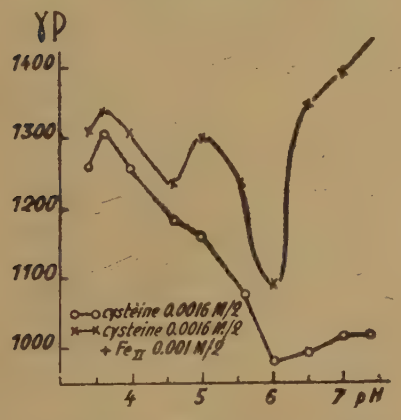


Figure 12. — *Activité pyrophosphatasique d'une préparation hépatique* (extraction d'une heure à l'eau) *en présence de cystéine* (*1,6.10^{-3} M*) et *en la présence ou en l'absence de* SO_4Fe (*10^{-3} M*).
Abscisses : pH.
Ordonnées : γ P libéré.

Pour les organes animaux comme pour les tissus végétaux, la valeur du pH optimum est liée aux conditions d'extraction, de purification et de conservation des enzymes. Ainsi que le montrent les résultats apportés au tableau XVII une extraction d'une heure à l'eau distillée permet d'obtenir des phosphatases actives surtout à pH = 5,6 dans le cas du rein, à pH = 4,0 dans celui du foie et à pH = 7,8 - 8,0 dans celui de l'intestin.

En définitive, la richesse d'un tissu en phosphatases déterminées et la valeur des pH optima, sont dans une certaine

(1) Les conditions expérimentales sont précisées plus loin (p. 132).

mesure sous la dépendance des conditions de préparation et de conservation de ces enzymes.

TABLEAU XVII. — *Activité pyrophosphatasique en fonction du pH, d'extraits de divers organes animaux.* — 2 cm³ de solution m/10 de pyrophosphate de Na + 4 cm³ de solution tampon au véronal sodique + 0,5 cm³ d'enzyme + eau distillée q.s. 10 cm³. 3 h.,30 à 37°. Chiffres en γ de P total libéré.

Préparation I : extraction 1 heure (1 partie de poudre acétonique + 30 parties d'eau distillée).

Préparation II : extraction de 48 heures.

Préparation III : extraction et purification suivant ALBERS.

pH	Rein de Bœuf			Foie de Chien		Intestin de Chien	
	I	II	III	I	II	I	II
3,6	**924**	**316**	168	435	447	**997**	798
4	861	**345**	**208**	**467**	**514**	997	**798**
4,6	840	264	189	351	362	787	819
5	793	**287**	189	346	351	787	798
5,6	**940**	207	157	267	288	735	724
6	882	224	**168**	267	273	714	**756**
6,4	861	230	157	241	257	703	724
7	840	264	315	220	320	871	882
7,4	814	368	304	**440**	525	1092	1050
8	861	**391**	436	378	**551**	**1239**	**1207**
8,4	**882**	391	**478**	378	509	1207	1207

CONCLUSIONS.

L'étude systématique des préparations enzymatiques obtenues avec divers tissus animaux et végétaux permet de dégager la signification générale des courbes d'activité phosphatasique en fonction du pH. Celles-ci, établies au moyen des préparations brutes ou purifiées, présentent souvent des variations qu'on a pris l'habitude d'attribuer soit à une sorte d'exclusivité de quelques tissus vis-à-vis d'une phosphatase donnée [10], soit à la présence de phosphatases nouvelles qui viennent grossir ainsi le nombre des enzymes isodynames soit-disant particuliers. L'existence de la phosphatase alcaline (pH optimum = 9), de la phosphatase acide (pH optimum = 5 - 5,6), de la phosphatase « très acide » est ainsi confirmée dans divers tissus.

Nous avons montré que les extraits enzymatiques, même dialysés, renferment fréquemment des effecteurs naturels qui inhibent les phosphatases à des pH correspondant probablement aux zones de stabilité de la combinaison Enzyme-effecteur. L'élimination de ces corps naturels, indispensable à la mise en évidence de certaines phosphatases, est obtenue par des dispositions spéciales relatives à la conservation des liqueurs enzy-

matiques et l'utilisation de techniques de purification variées. Les préparations brutes, riches en protéines, donnent en outre lieu, au cours des séjours prolongés à certains pH à 37°, et grâce au collage des protéines enzymatiques ou des effecteurs naturels sur des produits dénaturés, à des pertes d'activité inégales de diverses phosphatases ; il en résulte qu'à un pH donné, situé à la limite de l'action de plusieurs phosphatases, et grâce à l'action simultanée des fractions résiduelles de celles-ci, des effets synergiques simulant de véritables optima d'action nouveaux. Le choix judicieux des conditions d'hydrolyse enzymatique (temps et température) constitue alors un facteur important dans l'individualisation des pH optima des actions phosphatasiques.

Les courbes d'activité phosphatasique en fonction du pH établies au moyen des préparations purifiées peuvent également présenter des lacunes du fait que les opérations d'isolement aboutissent réellement à la séparation d'enzymes distincts ou simplement à l'élimination d'effecteurs. Nous avons montré les ressources que présente l'emploi de ces derniers pour déceler les pH optima des phosphatases dont l'activité a été réduite, au cours de l'extraction ou de la purification, par la destruction ou l'élimination d'effecteurs spécifiques : inhibiteurs naturels ou activateurs agissant sous l'influence du pH.

Dans les conditions expérimentales des hydrolyses enzymatiques, la présence du substrat et des produits de son hydrolyse faisant intervenir simultanément les équilibres

$$E + S \rightleftarrows ES \quad (2)$$

$$ES \rightleftarrows E + s + s' \quad (3)$$

ne permet pas d'apprécier l'importance de l'équilibre

$$E \rightleftarrows Apoe + Coe \quad (1)$$

Tandis que cette dernière réaction évolue lentement les deux premières, du type catalytique, sont presque instantanées. Le temps généralement limité des hydrolyses phosphatasiques (souvent deux à trois heures), qui ne permet pas toujours aux réactions des complexes d'évoluer vers leurs termes finaux laisse ainsi l'influence du pH s'exercer sur les réactions les plus rapides, et l'empêche de retentir pleinement sur la formation et la dissociation de l'holoenzyme.

En outre les deux réactions inverses de l'équilibre (1) ne possèdent pas forcément la même vitesse, celle-ci dépendant à la fois de la stabilité de l'holoenzyme et de la facilité de resyn-

thèse des constituants dissociés. Dans des conditions définies de pH, les effecteurs peuvent modifier la vitesse de la réaction :

$$E \rightleftarrows Apoe + Coe$$

Toutefois cette influence est forcément restreinte en raison d'une part du temps limité des hydrolyses enzymatiques et d'autre part de l'état des phosphatases qui sont peu ou pas dissociées par les techniques courantes d'extraction et de purification. La détermination des conditions de stabilité des phosphatases aux divers pH doit fournir des renseignements plus précis sur la constitution de ces enzymes.

***

II. — Influence du pH sur la stabilité des phosphatases.

Dans cette partie de notre travail nous avons étudié les possibilités de dissociation des phosphatases « acides » ou « alcalines » et les conditions de leur reconstitution à partir de leurs éléments. Dans le but d'aider au dédoublement de l'holoenzyme en ses constituants nous avons constamment adjoint à l'action du pH la dialyse qui permet en outre la séparation des deux constituants phosphatasiques (apophosphatase non diffusible et cophosphatase dialysable).

A. — Dissociation et reconstitution des phosphomonoestérases « très acides ».

Des expériences dont nous avons déjà fait état au Premier Chapitre (p. 80) ont montré qu'à pH = 9,0, les extraits de Basidiomycètes, de levure, à pH = 2,5 de foie peuvent perdre au cours de la dialyse, toute activité phosphomonoestérasique tout en gardant une activité appréciable vis-à-vis des pyrophosphates minéraux. Utilisant les données d'Albers et de ses collaborateurs, nous avons attribué cette destruction des phosphomonoestérases à une dissociation de cet enzyme en ses constituants.

Cette hypothèse doit être vérifiée en essayant de reconstituer la phosphatase à partir de ses éléments.

Dans ce but, des extraits de levure obtenus suivant la technique d'Albers sont dialysés à 18° contre des solutions tamponnées à pH = 7,4. Lorsque le phosphate minéral contenu dans la préparation est éliminé, on recueille les eaux de dialyse et on les concentre sous pression réduite à 35 - 40° C. Après une

dizaine de jours, toute activité phosphomonoestérasique ayant disparu, on procède aux essais de réactivation.

L'hydrolyse enzymatique, opérée dans les conditions habituelles s'effectue au moyen du liquide resté dans le sac de collodion, soit seul (Apoenzyme), soit en présence d'un mélange SO_4Mn + SO_4Mg + acétate de Ca (10^{-3} m/l) ou du produit de concentration des eaux de dialyse (Coenzyme). Avant l'hydrolyse, la Cophosphatase ou les cations sont mis en contact avec l'Apophosphatase pendant trois heures aux pH = 3,6 et 5,6, cette opération (incubation) devant permettre aux composants enzymatiques de s'unir à nouveau lentement. En outre des essais analogues sont répétés avec la cophosphatase seule ou en présence de Mg + Mn + Ca.

TABLEAU XVIII. — *Réactivation des phosphomonoestérases « acides » de levure basse.* — n cm³ d'apoenzyme ou d'enzyme + 4 cm³ tampon acétoacétique (pH = 3,6 et 5,6) + eau distillée q.s. 8 cm³. 3 heures à 37°. En l'absence ou en la présence de cophosphatase (2 cm³) ou du mélange SO_4Mn + SO_4Mg + acétate Ca 10^{-3} m/l. Ajouter ensuite 2 cm³ de solution M/10 de β-glycérophosphate de Na. 2 heures à 37°. Chiffres en γ de P total libéré.

Préparation	cm³ de solution d'enzyme ou d'apoenzyme	pH = 3,6	pH = 5,6
Apo seul	2	indosable	indosable
Apo + Ca + Mg + Mn	2	»	»
Apo + Coenzyme	2	225-230	190-180
Coe seul	0	0	0
Coe + Ca + Mg + Mn	0	0	0
Extrait non dialysé	0,5	1020-1050	850-880

Les résultats rapportés dans le tableau XVIII montrent que si le mélange des cations Mg^{++} + Mn^{++} + Ca^{++} activateurs généraux de la phosphomonoestérase « alcaline » ne restitue pas au dialysat son activité, le produit de concentration des eaux de dialyse permet une réactivation très appréciable ; ainsi le liquide resté dans le sac de collodion renferme l'apophosphatase. Comparée à l'activité initiale de l'extrait enzymatique non dialysé, celle du produit de « synthèse » est faible ; elle n'atteint que 25 p. 100 de la première. ALBERS avait déjà noté cette différence qu'il attribuait à la dénaturation de l'apoenzyme au cours des dialyses prolongées. A vrai dire, la dénaturation des apoenzymes protéiques est peut-être moins en cause qu'une méconnaissance des véritables conditions de réactivation.

B. — Dissociation et reconstitution de la phosphomonoestérase « alcaline ».

De la muqueuse intestinale de chien est traitée suivant la technique Albers. Le produit obtenu est soumis au fractionnement à l'acétone glacée (— 8°), suivant le protocole adopté pour l'isolement et la cristallisation de la phosphomonoestérase « alcaline » (p. 84). Cependant la fraction active, au lieu d'être abandonnée à la cristallisation, est immédiatement redissoute dans l'eau bidistillée. La solution enzymatique sert à la détermination de l'activité initiale. Elle est ensuite dialysée à 37° contre de l'eau bidistillée à pH = 5,8 - 6. Après vingt-cinq jours de dialyse, toute activité phosphatasique a pratiquement disparu. On procède alors aux essais de réactivation. L'hydrolyse enzymatique qui dure cinq minutes à 37°, s'effectue au moyen de 0,2 cm³ d'enzyme en présence de 2 cm³ de β-glycérophosphate de sodium m/10 + 4 cm³ de tampon véronal Michaelis (pH = 9,0) + eau bidistillée q.s. 10 cm³. L'hydrolyse est précédée, pour la réactivation, de l'opération d'incubation. Celle-ci consiste à mettre 0,20 cm³ d'enzyme au contact de 4 cm³ de solution tampon au véronal Michaelis (pH = 9,0) + effecteur (acétate Mg 10^{-2}) + alanine 10^{-2} M ou 0,5 cm³ du produit de concentration des eaux de dialyse + eau bidistillée q.s. 8 cm³ ; le mélange est porté à 37° pendant une heure à deux heures. On ajoute ensuite 2 cm³ de glycérophosphate de sodium m/10 + eau bidistillée q.s. 10 cm³, et on procède à une hydrolyse de cinq minutes. La mesure de l'activité initiale se fait sans incubation, cette dernière opération ayant alors pour effet d'inactiver partiellement la phosphatase à cause du pH alcalin du milieu.

Tableau XIX. — *Réactivation de la phosphomonoestérase « alcaline » par les produits de dialyse.*

Hydrolyse sans incubation : 2 cm³ solution m/10 β-glycérophosphate Na + 4 cm³ tampon véronal Michaelis + eau bidistillée 2 cm³. pH = 9,0. Porter à 37° pendant 10 minutes. Ajouter 0,2 cm³ enzyme + eau bidistillée q.s. 10 cm³. Hydrolyse 5 minutes à 37°.

Hydrolyse avec incubation : 0,2 cm³ enzyme + 4 cm³ tampon véronal (pH = 9,0) + solutions effecteurs + eau bidistillée q.s. 8 cm³. Porter à 37° pendant 2 h. Ajouter 2 cm³ solution m/10 glycérophosphate Na. Hydrolyse 5 minutes à 37°.

Chiffres : mg. P libéré par minute et par mg. N.

Sans incubation		Avec incubation	
Avant dialyse (activité initiale)	Après dialyse	Alanine 10^{-2} + Mg 10^{-2}	Produit de dialyse
0,419	indosable	2,176	2,294

Les résultats portés aux tableaux XIX et XIX bis expriment l'activité en γ de P minéral libéré par minute et par mg. N d'apoenzyme protéique.

La réactivation de la phosphomonoestérase « alcaline » est alors totale. L'augmentation considérable de l'activité exprimée par rapport à la teneur en N, s'explique par l'élimination des produits qui accompagnent l'apoenzyme et qui diffusent à travers le sac de collodion. Quelques faits principaux méritent d'être relevés : a) la dialyse à pH = 5,6 a effectivement dissocié l'enzyme ; le produit resté dans le sac de collodion utilisé sans traitement préalable (incubation) se montre inactif ; — b) le fait de reporter le produit inactivé au pH optimum de la phosphomonoestérase « alcaline » à une température (37°) suffisante pour accélérer la réaction, restaure l'activité initiale de l'enzyme ; — c) l'addition du produit de concentration des eaux de dialyse fournit un enzyme environ cinq fois plus actif que la préparation initiale. Ainsi la phosphomonoestérase « alcaline » (pH optimum = 9,0) dialysée à pH = 5,6 se dissocie en ses éléments ; l'un d'entre eux diffuse à travers le sac de collodion mais partiellement. La reconstitution entière de l'holophosphatase est possible par maintien des éléments dissociés au pH optimum de l'enzyme à 37° pendant un temps (une, deux heures) beaucoup plus court que celui nécessaire à sa dissociation (vingt-cinq jours).

Conclusions. — Les phosphomonoestérases « acides » de levure basse et la phosphomonoestérase « alcaline » de l'intestin peuvent être inactivées par dialyse des premières à pH < 7,4, la seconde à pH = 5,6. Cette inactivation est due à une dissociation de l'holophosphatase en Apophosphatase et Cophosphatase. Effectivement la recombinaison des éléments dissociés par leur maintien au pH optimum à 37° permet une restauration partielle ou totale du produit initial. Les différences d'activité observées avec la levure basse, entre l'enzyme initial et le produit de synthèse, ne résultent sans doute pas d'une dénaturation de l'apoenzyme protéique à la suite de dialyses prolongées ; l'apoenzyme de la phosphomonoestérase « alcaline », dialysé beaucoup plus longuement et à la température plus élevée ne semble pas être dénaturé, car il est possible d'obtenir une réactivation totale de l'enzyme primitif.

La dissociation des phosphatases est une réaction lente ; elle n'est complète qu'au bout de douze jours dans le cas des phosphomonoestérases « acides » et d'environ trois semaines dans celui de la phosphomonoestérase « alcaline ». La recombinai-

son des éléments dissociés est par contre relativement beaucoup plus rapide et n'exige dans le cas de la phosphomonoestérase « alcaline » qu'une à deux heures. Ces faits prouvent l'influence que peut avoir le pH au cours des hydrolyses enzymatiques ordinaires. Dans la détermination des courbes d'activité phosphatasique en fonction du pH où la durée des hydrolyses enzymatiques n'excède généralement pas deux heures il est très peu probable que les écarts d'activité observés aux divers pH puissent provenir d'une dissociation de l'enzyme, d'ailleurs protégé par le substrat. Elles ne peuvent pas non plus provenir d'une combinaison exclusive au pH optimum des éléments dissociés à l'état naturel, la présence du substrat gênant considérablement une telle réaction. Il est possible cependant que dans les hydrolyses enzymatiques suffisamment prolongées, une holophosphatase incomplètement saturée en cophosphatase ou en effecteur, puisse à son pH optimum, et sans changement essentiel de sa structure, fixer de nouveaux groupements actifs et réaliser un nouveau gain d'activité.

CONCLUSIONS.

L'influence du pH peut théoriquement s'exercer sur les trois équilibres enzymatiques que nous avons distingués au début de ce travail. Pratiquement la dissociation des phosphatases en leurs deux constituants, qui se produit lorsqu'elles sont dialysées à des pH compris dans la zone d'instabilité de ces enzymes, est une réaction très lente. La vitesse minime de celle-ci ne peut expliquer les écarts d'activité observés sur les courbes d'activité en fonction du pH. La formation de l'holophosphatase à partir de ses éléments est par contre plus rapide ; très fortement gênée par la présence du substrat, elle ne permet pas d'expliquer l'existence des pH optima par le seul jeu du premier équilibre dans les préparations où l'enzyme n'a pu être dissocié par les méthodes courantes d'extraction et de purification. Toutefois il est possible que la saturation en groupements actifs d'une holophosphatase partiellement active, puisse survenir dans un temps limité ; elle expliquerait alors les variations d'activité en fonction du pH. Cette possibilité permet sans doute d'expliquer l'action d'effecteurs spécifiques en la présence desquels les pH optima de certaines phosphatases sont plus nets, ce qui aide à leur détermination.

La stabilité particulière de l'holophosphatase, qui se dissocie difficilement dans les conditions ordinaires d'une extraction aqueuse, laisse supposer que les inhibiteurs naturels qui accom-

pagnent les phosphatases « acides » ne doivent pas intervenir en gênant la reconstitution de celles-ci à partir de leurs constituants. Il est plus vraisemblable que ces corps gênent la dissociation du complexe Enzyme-Substrat et la formation de ce complexe par blocage des groupements actifs. Le pH conditionne la formation des complexes Phosphatase-inhibiteur inactifs et Phosphatase-Substrat-inhibiteur indissociables.

La signification des pH optima doit être recherchée principalement dans l'influence de la concentration des ions $H^{\cdot}$ sur les réactions du type catalytique : équilibres (2) et (3). L'action du pH, immédiate sur des réactions naturellement rapides, devient déjà sensible dans les conditions expérimentales où le temps d'hydrolyse peut ne pas excéder quelques minutes. La théorie veut d'ailleurs que la réaction (3) soit instantanée et sa vitesse souvent non mesurable, tandis que la réaction (2) est plus lente et accessible aux méthodes courantes de mesure. Il apparaît alors comme probable que l'action du pH se manifeste essentiellement au moment où l'enzyme se combine au substrat. Dans le cadre de cette hypothèse, l'existence de plusieurs pH optima dans le domaine des phosphatases traduirait une relation étroite entre les divers degrés de dissociation électrolytique des dérivés phosphoriques et l'aptitude des phosphatases à se combiner à eux à un pH déterminé.

CHAPITRE III.

EFFECTEURS DES PHOSPHATASES.

Si la spécificité des phosphatases vis-à-vis du substrat et du pH optimum est parfois très difficile à préciser, l'individualité de ces enzymes, définie par leur comportement à l'égard des effecteurs, présente une imprécision tout aussi grande. De nombreuses variations de la sensibilité aux effecteurs sont attribuées à l'influence des protéines qui accompagnent l'enzyme et dont le mélange en proportions variables détermine finalement ses caractères. Ces interprétations ont trouvé une de leurs expressions les plus générales dans l'existence présumée des lyo et desmophosphatases [46].

De telles généralisations font souvent perdre de vue l'importance d'autres facteurs : tels que la présence d'effecteurs naturels d'origine minérale, le rôle des coactivateurs, l'affinité des cations vis-à-vis des apoenzymes. L'action irrégulière d'effecteurs sur un enzyme provient d'impuretés diverses qui altèrent un grand nombre d'expériences, mais aussi de la non réalisation des conditions optima d'action des effecteurs dans de nombreuses expériences.

La définition précise de celles-ci constitue le but essentiel de notre travail car elle permet de caractériser avec quelque sécurité la spécificité des phosphatases.

⁂

I. — Etat de l'enzyme et degré de sensibilité aux effecteurs.

(*Sur l'existence réelle des lyo et desmo-phosphatases*).

Comme nous l'avons vu, la mise en évidence des phosphomonoestérases « très acides » dans les préparations de Basidiomycètes, de soja et d'amande douce, est liée à l'élimination d'inhi-

biteurs naturels. La stabilité de ces derniers conditionnant les caractères des extraits phosphatasiques dépend elle-même des phénomènes d'autolyse. Ces faits, ainsi que d'autres relatifs à l'inactivation de certaines phosphatases des hématies, du foie, témoignent de l'importance des colloïdes qui accompagnent l'enzyme.

La présence de ceux-ci ne permet pas toutefois d'expliquer tous les caractères des préparations phosphatasiques, en particulier leur sensibilité aux cations. L'action de ces derniers est encore liée à d'autres facteurs que nous allons essayer de mettre en évidence.

A. — Action des cations sur diverses préparations de phosphomonoestérase « acide » du foie.

La phosphomonoestérase « peu acide » n'est en général pas activée par des ions tels que Ca^{++}, Mg^{++}, Mn^{++}, Fe^{++}, Zn^{++} ; parfois même elle est inhibée par certains d'entre eux, tels que Mg. Ces variations prouvent que des impuretés accompagnant l'enzyme modifient son comportement. L'examen de quelques préparations hépatiques rend compte des changements les plus caractéristiques à cet égard.

1°) *Matériel d'étude et technique.*

Les extraits enzymatiques sont obtenus par simple macération d'une heure dans l'acide acétique N/30 (I) ou par autolyse de 60 jours dans le même milieu (II) de poudre acétonique de foie. Ces préparations sont utilisées avant ou après dialyse de vingt-quatre heures contre de l'eau distillée (I.d. et II.d.).

L'hydrolyse, réalisée suivant le protocole déjà décrit (p. 78), est faite en l'absence ou en la présence d'acétate de calcium, de sulfates de magnésium, de manganèse, de fer, à la concentration 10^{-3} m/l et de sulfate de zinc à la concentration de 10^{-5} m/l.

2°) *Résultats.*

L'examen du tableau XX montre qu'avant la dialyse, les divers cations, à l'exception de Ca, inhibent d'une façon importante l'extrait de une heure, tandis qu'ils activent légèrement ou restent sans effet sur l'autolysat. Après dialyse, les divers extraits se comportent de façon identique à l'égard des cations qui exercent sur la phosphomonoestérase « acide » une inhibition régulière.

Tableau XX. — *Action de Ca, Mg, Mn, Fe, Zn sur l'activité phosphomonoestérasique de diverses préparations hépatiques.* — 2 cm³ solution m/10 β-glycérophosphate Na + 4 cm³ tampon acétoacétique + 1 cm³ solution enzymatique + eau distillée q.s. 10 cm³. pH = 5,3. En la présence ou en l'absence de Ca, Mg, Mn, Fe (10^{-3} M/l), Zn((10^{-5} M/l). 3 h.,30 à 37°. Chiffres en γ de P total libéré.
I : extraction acétique n/30 ; Id : le même dialysé.
II : autolysat de 60 jours ; IId : le même dialysé.

Réactifs ajoutés	γ P libéré				p. 100 activation (+) ou inhibition (—)			
	I	Id	II	IId	I	Id	II	IId
Témoin..	726	468	1650	486	—	—	—	—
» ..	726	468	1650	486	—	—	—	—
Ca	375	372	1522	360	—49	—20	— 7	—24
Mn.....	578	348	1715	336	—21	—25	+ 3	—30
Mg.....	438	288	1610	384	—40	—38	0	—20
Fe	516	168	1955	288	—30	—69	+18	—40
Zn	516	312	2000	312	—30	—33	+21	—33

3°) *Discussion des résultats.*

Les faits observés montrent en premier lieu l'influence de certains produits d'autolyse dont la présence permet l'activation de la phosphomonoestérase « acide » par des cations. L'élimination de ces impuretés au cours de la dialyse détermine l'inhibition de l'enzyme par les mêmes métaux. Cette inversion de l'action des cations témoigne de la présence des coactivateurs sur laquelle nous reviendrons. Notons dès maintenant que les changements observés dans l'action des cations ne peuvent être attribués à la présence des protéines qui accompagnent l'enzyme. Ils prouvent que la sensibilité de celui-ci aux effecteurs n'est pas déterminée spécialement par l'abondance des colloïdes. L'existence présumée des lyo et desmo-phosphatases ne suffit pas à expliquer des variations d'activation qui paraissent moins liées à l'influence des protéines qu'à celle d'effecteurs dialysables.

B. — Action des cations sur diverses préparations de phosphomonoestérase « alcaline » dialysées dans des conditions diverses.

La dialyse contre des formateurs de complexes, élimine les cations présents dans les extraits enzymatiques, et celle contre des solutions de sels métalliques, en fixe sur les phosphatases. Les changements de concentration en métaux ainsi déterminés dans les préparations phosphatasiques facilitent nos observa-

tions sur le comportement de celles-ci à l'égard de nouvelles additions de cations.

1°) *Matériel d'étude et technique.*

De la poudre acétonique de muqueuse intestinale de chien est extraite par vingt parties d'eau distillée pendant une heure. Elle est ensuite dialysée, soit contre de l'eau distillée additionnée de traces de bicarbonate de sodium pendant six jours (A), soit contre des solutions m/1000 de diéthyldithiocarbamate de sodium ou d'αα'-dipyridyl pendant trois jours. Dans ce dernier cas, la première période de dialyse a été suivie d'une seconde de trois jours soit contre de l'eau bicarbonatée de pH = 7,4 (B), soit contre une solution contenant de l'acétate de calcium, des sulfates de magnésium, de manganèse et de fer (10^{-4} m/l) et de sulfate de zinc (10^{-6} m/l) (C). Tous les extraits ont été ramenés en fin de dialyse à un volume tel que leur teneur initiale en enzyme soit la même dans chaque série.

L'hydrolyse enzymatique est faite dans les conditions habituelles à pH = 9, en la présence ou en l'absence d'acétate de calcium, de sulfates de magnésium, manganèse, fer (10^{-3} m/l) et de sulfate de zinc (10^{-6} m/l).

2°) *Résultats.*

On observe (tableau XXI) qu'il se produit une augmentation de l'activité après dialyse contre des formateurs de complexes. En outre les cations exercent un certain effet activateur (Mg, Mn) ou inhibiteur (Fe, Zn) dont l'intensité et même le sens sont liés aux circonstances de la dialyse et en définitive aux concentrations actuelles des cations dans les préparations enzymatiques.

Après dialyse contre des formateurs de complexes, l'action des effecteurs est plus ou moins intense selon la nature de la dialyse. Lorsque celle-ci est suivie d'une seconde opération identique contre une solution saline renfermant les divers cations examinés, on observe une diminution de l'activation par le magnésium et le manganèse, un renforcement de l'inhibition par le fer et le zinc et une inversion de l'effet activateur du calcium en effet inhibiteur.

3°) *Discussion des résultats.*

L'interprétation des faits observés est basée, d'une part sur l'élimination des cations présents dans les solutions enzymatiques au cours de la dialyse contre des formateurs de complexes

TABLEAU XXI. — *Action de divers ions métalliques sur la phosphomonoestérase alcaline de deux préparations d'intestin de Chien dialysées dans des conditions diverses (A, B et C).* — 2 cm³ de solution M/10 de β-glycérophosphate de Na + 4 cm³ de tampon au véronal sodique M/15 + 0,5 cm³ de solution enzymatique. Volume total : 10 cm³. Les sels de Ca (acétate), Mg, Mn, Fe (sulfates) sont à la concentration de 10^{-3} millimol./litre. pH = 9,2. Durée de l'hydrolyse : 3 h. 30. Température 37°. Chiffres en γ de P total libéré.

Préparation enzymatique obtenue par extraction d'une heure à l'eau distillée. Dialyses à pH = 7,4.

Réactifs ajoutés	Dialyse à l'eau bicarbonatée		Dialyse au diéthyldithiocarbamate de Na *M*/1000				Dialyse à l'eau bicarbonatée		Dialyse à l'αα'-dipyridyl *M*/1000			
	Préparation A		Préparation B		Préparation C		Préparation A		Préparation B		Préparation C	
	γ P libéré	p. 100 d'activation	γ P libéré	p. 100 d'activation	γ P libéré	p. 100 d'activation	γ P libéré	p. 100 d'activation	γ P libéré	p. 100 d'activation	γ P libéré	p. 100 d'activation
Témoin	493		1659		3150		619		955		1365	
Ca	745	+ 53	2076	+ 25	2667	— 15	955	+ 52	1365	+ 42	1050	— 23
Mg.....	2037	+313	4095	+147	4200	+ 33	2226	+257	2562	+165	2100	+ 53
Mn.....	2079	+324	4357	+163	3990	+ 26	1974	+220	2100	+119	1848	+ 30
Fe.....	304	— 38	1218	— 27	1522	— 51	450	— 19	798	— 16	462	— 66
Zn	325	— 34	1092	— 34	1522	— 51	325	— 47	525	— 45	430	— 68
Ca+Mg+Mn	2037	+313	4095	+147	2990	+ 26	2226	+257	2583	+ 165	1869	+ 47
Ca+Mg+Mn+Fe+Zn	1638	+230	2585	+122	3622	+ 15	1848	+191	2163	+126	1596	+ 16

et d'autre part sur la fixation des métaux sur les phosphatases, à la suite de la dialyse contre des solutions salines. La première opération supprime un excès de cations dont quelques-uns (Fe, Zn) sont inhibiteurs à des concentrations moyennes et augmente l'activité phosphatasique. Celle-ci est encore plus accrue après dialyse contre des solutions diluées de sels métalliques. L'enzyme présente alors une teneur optima en cations : l'addition, au moment de l'hydrolyse, d'une nouvelle quantité de métaux détermine alors un médiocre effet activateur (Mg, Mn), entraîne une inhibition nouvelle (Ca) ou renforce celle-ci (Zn, Fe). La sensibilité des extraits phosphatasiques aux effecteurs dépend ainsi de la concentration actuelle des cations primitivement ou artificiellement fixés sur l'enzyme. Elle dépend ainsi de l'action concurrente entre les divers cations possédant des affinités variables pour les protéines.

C. — Action concurrente des cations sur la phosphomonoestérase « alcaline ».

Les divers cations activent à des degrés différents la phosphomonoestérase « alcaline ». Leur action simultanée consiste en une simple concurrence ou en une coactivation. Celle-ci dépend ainsi de l'interréaction des cations sur l'apoenzyme, en dehors d'autres influences.

1°) *Matériel d'étude et technique.*

Les préparations enzymatiques employées ont été obtenues par extraction aqueuse de la muqueuse intestinale fraîche et dialyse à 37° pendant sept jours contre de l'eau bidistillée, puis pendant quatre jours contre une solution 10^{-3} m/l d'αα' dipyridyl et enfin pendant quinze jours contre de l'eau bidistillée. L'efficacité des opérations de dialyse est contrôlée à des intervalles réguliers afin, d'une part que les milieux soient mis en expérience avant leur inactivation totale, survenant toujours après un temps de dialyse trop long, et d'autre part, que l'élimination des métaux soit suffisante pour que l'on obtienne une réactivation importante par certains ions.

L'hydrolyse a été opérée dans les conditions habituelles en la présence ou en l'absence de magnésium, calcium, manganèse, fer, zinc, dont les sels (acétate de Ca et sulfate de Mg, Mn, Fe, Zn) ont été ajoutés aux milieux à des concentrations diverses allant de 2.10^{-5} m/l à 10^{-2} m/l. Dans les cas particuliers de mélange de sels apportant Mg, Ca et Mn, la concentration de

chacun est uniformément 10^{-4} M, des sels de Fe et de Zn étant par ailleurs introduits simultanément à des taux divers indiqués dans les tableaux ci-dessous.

2°) *Résultats.*

Les concentrations optima d'activateurs et les pourcentages d'activation ou d'inhibition varient avec les métaux essayés. L'association du calcium, magnésium et manganèse, produit un effet activateur puissant mais qui n'est pas plus élevé, à concentrations égales, que celui déterminé par Mg ou Mn seul. L'addition aux trois cations associés, soit de fer, soit de zinc

TABLEAU XXII. — *Action de Ca, Mg, Mn et de leur mélange, sur la phosphomonoestérase « alcaline » de l'intestin.* — 2 cm³ de solution m/10 de β-glycérophosphate de Na + 4 cm³ solution tampon au véronal sodique + eau distillée q.s. 10 cm³. En la présence ou en l'absence de Ca, Mg, Mn, Fe, Zn. pH = 9,0. 2 heures à 37°. Chiffres en γ de P total libéré.

Concentration moleculaire en sel	γ P libérés en présence de				p. 100 d'activation (+) en présence de			
	Ca++	Mg++	Mn++	Ca++ + Mg++ + Mn++	Ca++	Mg++	Mn++	Ca++ + Mg++ + Mn++
1.10^{-4} M....	—	—	—	2200	—	—	—	+6376
5.10^{-4} M....	535	1364	2178	—	+1561	+3911	+6306	—
1.10^{-3} M....	630	2200	2178	—	+1752	+6373	+6306	—
5.10^{-3} M....	866	2640	1848	—	+2447	+7664	+5345	—
1.10^{-2} M....	780	2816	1694	—	+1900	+8182	+4882	—
0 (*Témoin*)	34				0			

TABLEAU XXII bis. — *Action de Fe^{++} et de Zn^{++} en la présence ou en l'absence de Ca^{++} + Mg^{++} + Mn^{++} (1.10^{-4} M) sur la phosphomonoestérase alcaline de l'intestin).*

Concentration moléculaire en sel de fer ou de zinc	γ P libérés en présence de				p. 100 d'activation (+) ou d'inhibition (—) en présence de			
	Fe++	Zn++	Ca++ + Mg++ + Mn++ et		Fe++	Zn++	Ca++ + Mg++ + Mn++ et	
			Fe++	Zn++			Fe++	Zn++
2.10^{-5} M....	—	34	—	1408	—	0	—	+4041
5.10^{-5} M....	32	27	1100	200	— 5	—21	+3135	+ 488
1.10^{-4} M....	14	24	232	33	—45	—31	+ 582	— 2
5.10^{-4} M....	—	21	21	—	—	—38	— 38	—
Témoins: sans métal = 34, avec Ca++ + Mg++ + Mn++ 1.10^{-4} = 2200					sans métal = 0, avec Ca++ + Mg++ + Mn++ 1.10^{-4} M = + 6376			

détermine une baisse considérable du pourcentage d'activation et pour des concentrations croissantes, quoique encore assez faibles, de ces métaux (5.10^{-4}), une inhibition appréciable de la phosphomonoestérase « alcaline ».

3°) *Discussion des résultats.*

Sans insister sur l'action inhibitrice propre de Fe^{++} et Zn^{++} sur laquelle nous reviendrons plus loin, nous pouvons noter que *dans les conditions où ces cations inhibent la phosphomonoestérase*, ils réduisent considérablement l'activation de celle-ci par Ca, Mg et Mn. Ce fait exprime nettement une affinité plus forte des cations Fe et Zn pour l'apoenzyme et une concurrence vis-à-vis de Ca, Mg, Mn, dont l'action est ainsi réduite. Ainsi des préparations phosphatasiques n'offrent apparemment aucune sensibilité vis-à-vis de puissants activateurs (Mg, Mn) lorsqu'elles renferment une certaine teneur de cations jouant, à l'égard des premiers, un rôle concurrent. La présence d'effecteurs minéraux dialysables, capables d'action synergique, modifie seule d'une façon appréciable le comportement des phosphatases à l'égard de leurs activateurs.

D. — Sensibilité aux effecteurs de diverses préparations phosphatasiques, en fonction du temps de dialyse.

La distinction de lyo- et de desmo-enzymes qui rend compte des différences de solubilité et de sensibilité aux effecteurs, est basée initialement sur le degré de la fixation de diverses fractions enzymatiques aux constituants cellulaires colloïdaux. Elle a été en outre attribuée aux positions différentes des groupements actifs de l'apoenzyme. Les essais qui viennent d'être rapportés ayant prouvé le rôle important des effecteurs minéraux sur les caractères des phosphatases, nous avons entrepris de comparer les diverses fractions lyoenzymatiques entre elles et avec les desmo-enzymes au cours des dialyses de longue durée. Cette comparaison est basée essentiellement sur leur sensibilité vis-à-vis des sels de calcium, magnésium, manganèse en fonction de divers temps de dialyse.

1°) *Matériel d'étude et technique.*

Pour la préparation des extraits enzymatiques nous avons suivi les indications de Bamann et de ses collaborateurs [37]. De la muqueuse intestinale de chien, fraîchement prélevée, est extraite pendant un quart d'heure par trois parties d'eau dis-

tillée (I) ou d'ammoniaque n/25 (II) ; après centrifugation le résidu solide d'extraction est mis en suspension dans trois parties d'eau distillée (III). Les diverses préparations sont dialysées en présence de toluène dans des sacs de collodion contre de l'eau bidistillée d'abord à 18° pendant deux jours, ensuite à 37° pendant quinze à trente jours.

L'hydrolyse enzymatique est précédée ou non d'une incubation préalable à 37° et à pH = 9 de la phosphomonoestérase « alcaline » avec l'effecteur. Les protocoles d'incubation et d'hydrolyse sont identiques à ceux adoptés pour les autres essais. Afin de comparer les pertes et les gains d'activité au cours de la dialyse nous avons exprimé ceux-ci en mg. de P libéré par mg. d'azote dosé (suivant la technique du micro-kjeldahl) et par minute.

TABLEAU XXIII. — *Action de divers cations sur des extraits aqueux et ammoniacaux en fonction du temps de dialyse.*

Hydrolyse sans incubation : 2 cm³ de solution m/10 de β-glycérophosphate de Na + 4 cm³ de solution tampon au véronal sodique + 0,5 cm³ d'enzyme + eau bidistillée q.s. 10 cm³. En la présence ou en l'absence d'effecteurs. pH = 9,0. 1/4 d'heure à 37°.

Hydrolyse avec incubation : 0,5 cm³ d'enzyme + 4 cm³ de solution tampon au véronal + eau bidis illée q.s. 8 cm³. En la présence ou en l absence d'effecteurs. 5 heures à 37°. pH = 9,0. Ajouter 2 cm³ de solution m/10 de glycérophosphate de Na. 1/4 d'heure à 37°. Chiffres en γ de P par mg. N et par minute.

Réactifs ajoutés (M/l)	Extrait aqueux				Extrait ammoniacal			
	Sans incubation		Avec incubation		Sans incubation		Avec incubation	
	γ P dosés	p. 100 activation (+) inhibition (—)	γ P dosés	p. 100 activation (+) inhibition (—)	γ P dosés	p. 100 activation (+) inhibition (—)	γ P dosés	p. 100 activation (+) inhibition (—)
Extraits dialysés 3 jours à 18°								
Témoin..	592		416		252		364	
Ca 5.10⁻⁵.	592	0	458	+10	272	+ 8	329	— 9
1.10⁻⁴.	592	0	522	+26	272	+ 8	329	— 9
5.10⁻⁴.	640	+ 8	522	+26	268	+ 6	353	— 3
Mg 5.10⁻⁵.	664	+ 8	458	+10	336	+33	405	+11
1.10⁻⁴.	692	+16	—	—	—	—	—	—
5.10⁻⁴.	744	+25	592	+30	475	+88	405	+11
Extraits dialysés 10 jours à 37°								
Témoin..	58		373		87		154	
Ca 5.10⁻⁵.	90	+ 55	453	+ 21	87		168	+ 9
1.10⁻⁴.	110	+ 92	453	+ 21	111	+ 27	431	+ 18
5.10⁻⁴.	147	+ 148	510	+ 36	151	+ 73	—	—
Mg 5 10⁻⁵.	569	+ 876	715	+ 89	348	+286	994	+480
1.10⁻⁴.	770	+1228	859	+130	454	+421	664	+381
5.10⁻⁴.	801	+1281	637	+ 70	559	+531	—	—

2°) *Résultats.*

Nous avons comparé d'une part les extraits aqueux et ammoniacaux et d'autre part les fractions solubles et insolubles.

Tableau XXIII bis. — *Action de divers cations sur les fractions solubles et insolubles en fonction du temps de dialyse :* même protocole qu'au tableau XXIII. L'incubation dure 1 heure à 37°.

Réactifs ajoutés (M/l)	Fraction soluble				Fraction insoluble			
	Sans incubation		Avec incubation		Sans incubation		Avec incubation	
	γ P dosés	p. 100 activation (+) inhibition (—)	γ P dosés	p. 100 activation (+) inhibition (—)	γ P dosés	p. 100 activation (+) inhibition (—)	γ P dosés	p. 100 activation (+) inhibition (—)
Extraits dialysés 2 jours à 18°								
Témoin..	653		517		285		142	
Ca 5.10^{-5}.	835	+ 27	483	— 8	240	— 14	127	— 10
1.10^{-4}.	—	—	483	— 6	270	— 5	127	— 10
5.10^{-4}.	528	— 19	494	— 4	180	— 36	127	— 10
Mg 5.10^{-5}.	—	—	533	+ 3	150	— 47	135	— 4
1.10^{-4}.	795	+ 21	533	+ 3	150	— 47	138	— 4
5.10^{-4}.	727	+ 11	557	+ 7	—	—	135	— 4
Mn 5.10^{-5}.	750	+ 18	483	— 6	180	— 36	90	— 36
1.10^{-4}.	727	+ 11	386	— 25	—	—	78	— 45
5.10^{-4}.	710	+ 10	—	—	158	— 44	75	— 47
Extraits dialysés 15 jours à 37°								
Témoin..	138		234		32		159	
Ca 5.10^{-5}.	118	— 14	287	+ 22	30	— 7	168	+ 5
1.10^{-4}.	—	—	—	—	30	— 7	—	—
5.10^{-4}.	138	0	332	+ 41	45	+ 40	175	+ 10
Mg 5.10^{-5}.	235	+ 70	1141	+387	55	+ 72	434	+172
1.10^{-4}.	235	+ 70	1172	+400	91	+184	493	+210
5.10^{-4}.	600	+334	1376	+488	183	+475	390	+145
Mn 5.10^{-5}	844	+511	820	+250	253	+690	215	+ 35
1.10^{-4}.	880	+538	793	+238	322	+906	—	—
5.10^{-4}.	978	+708	629	+168	334	+947	253	+ 59

a) *Activation des extraits aqueux et ammoniacaux.* — Après quarante-huit heures de dialyse les extraits ne contiennent plus de P libre ; sans doute les autres cations sont également éliminés. Cependant l'enzyme doit être lui-même saturé de cations, ces derniers formant des complexes avec les protéines. L'action du calcium et du magnésium sur la phosphomonoestérase est alors très faible ; dans le cas du calcium elle est irrégulère et se montre tantôt activatrice, tantôt inhibitrice ; l'activation par le magnésium est régulière mais faible. Dans ce dernier cas on

observe une meilleure activation de l'extrait ammoniacal par rapport à l'extrait equeux.

Après dix jours de dialyse, entrainant la dissociation et l'élimination de certains cations, l'enzyme offre une sensibilité accrue à la présence des cations. Mais l'extrait aqueux se montre en général deux à trois fois plus activable que l'extrait ammoniacal par le calcium comme par le magnésium.

b) *Activation des fractions solubles et insolubles.* — Après quarante-huit heures de dialyse on observe une différence profonde entre les deux fractions : l'extrait soluble est activé légèrement par le calcium, le magnésium, le manganèse tandis que le résidu d'extraction subit une forte inhibition en présence des même cations. Après quinze jours de dialyse et selon les conditions d'hydrolyse, les deux préparations présentent le même degré de sensibilité vis à vis des cations examinés.

3°) *Discussion des résultats.*

La comparaison des fractions solubles (lyoenzymes) entre elles et avec le résidu d'extraction (desmoenzyme) appelle trois observations principales : a) la faible sensibilité des diverses préparations à l'influence des cations au début de la dialyse. — b) l'augmentation du pourcentage d'activation en fonction du temps de dialyse. — c) la disparition à la fin de l'opération des inégalités observées dans le degré d'activation des fractions solubles et insolubles.

Ces observations tiennent au fait que la dialyse, en éliminant les effecteurs naturels, rend les phophatases plus facilement activables. Certaine inhibition par le calcium au début de l'expérience rappelle les essais antérieurs où l'enzyme est artificiellement saturé de sels métalliques. Elle disparait ensuite pour faire place à une forte activation par le même métal lorsque la phosphatase est débarrassée de ses effecteurs naturels. Les extraits aqueux, plus chargés en protéines que les extraits ammoniacaux, sont sans doute également plus riches en cations formant des complexes avec les impuretés colloïdales ; les premiers extraits restent donc moins activables que les seconds jusqu'au moment où la dialyse les a suffisamment débarassés des corps métalliques. La disparition en fin de dialyse des différences initiales observées sur les fractions solubles et insolubles s'explique de la même manière.

CONCLUSIONS.

L'ensemble des observations montre l'influence considérable des cations sur le comportement des phosphatases «acides» et « alcalines ». En présence de métaux formant à l'état naturel des complexes avec l'apoenzyme ou avec des ballastes protéiques ou artificiellement fixés sur ceux-ci par dialyse contre des solutions salines, les phosphatases sont peu actives ou même inhibées par l'addition de cations surtout lorsque ceux-ci présentent une forte affinité pour l'enzyme. Après leur élimination par dialyses prolongées, les phosphatases présentent une augmentation de leur sensibilité à l'influence activatrice du calcium, du magnésium et du manganèse.

Ces variations dans le degré de sensibilité aux effecteurs des fractions solubles (dites lyoenzymes) ou insolubles (dites desmoenzymes) sont indépendantes de la richesse de celles-ci en constituants colloïdaux. A la fin de la dialyse, les extraits ammoniacaux comme les extraits aqueux, ceux-ci comme les résidus d'extraction, offrent le même pourcentage d'activation par le calcium, le magnésium et le manganèse.

Les observations de Bamann et de ses collaborateurs ne sont donc justifiées que dans la mesure où la dialyse n'a pas été suffisante pour éliminer les effecteurs naturels. Le rôle qui a été dévolu aux protéines dans le comportement et la distinction des lyo et desmoformes revient pour une part importante aux impuretés inorganiques. L'importance injustifiée accordée jusqu'à présent à la notion des lyo et desmoenzymes, qui va jusqu'à faire attribuer des différences de structure aux deux fractions enzymatiques, fait souvent perdre de vue l'influence des métaux qui accompagnent l'enzyme et modifient ses caractères. Celle-ci constitue cependant un facteur essentiel dans les premières phases d'étude d'un enzyme dont la purification n'a pas été jugée suffisante.

II. — Sur la coactivation.

La purification qui a pour effet de rendre les phosphatases plus sensibles aux ions métalliques peut éliminer des effecteurs qui agissent synergiquement avec les premiers afin d'exalter l'activité enzymatique. Leur suppression a pour conséquence d'empêcher l'action de certains cations. Nous avons noté ainsi que les autolysats de foie (phosphomonoestérase « acide ») sont activés par le calcium, le magnésium, le manganèse, le fer

et le zinc avant dialyse et ne le sont plus après. Ce fait prouve l'existence de coactivateurs.

A. — Action du couple cystéine-Fe_{II} sur la pyrophosphatase « alcaline ».

Au cours des recherches sur les pyrophosphatases animales, nous avons observé que l'activation de certains de ces enzymes par Fe_{II} peut être régularisée et très fortement augmentée par la cystéine. Nous avons précisé de la façon suivante les conditions d'action du couple cystéine-Fe_{II} sur les pyrophosphatases.

1°) *Matériel d'étude et technique.*

De la poudre acétonique de foie et de muqueuse intestinale de chien a été extraite pendant une heure et quarante-huit heures à l'eau distillée (préparations A et B) et pendant un quart d'heure à l'ammoniaque n/20 (préparation C). Il a en outre été utilisé des préparations rénales obtenues par la méthode d'Albers, purifiées par quatre dissolutions successives dans l'eau alternées de précipitations à l'acétone 60 p. 100. Toutes les solutions enzymatiques sauf les préparations A et B ont été dialysées à pH = 7,4 pendant vingt-quatre ou quarante-huit heures, la durée de dialyse étant limitée par la stabilité de l'enzyme relativement faible de certains organes (foie). L'hydrolyse enzymatique est faite en présence de glycérophosphate ou de pyrophosphate dans les conditons décrites.

2°) *Résultats.*

Les résultats obtenus font ressortir les faits suivants :

a) *Activation de la pyrophosphatase « alcaline » du foie.* — Le couple cystéine-Fe_{II} exerce une activation de la pyrophosphatase « alcaline » du foie bien supérieure à la somme de celle de ses constituants. Cette action est d'autant plus forte que les préparations sont plus pauvres en protéines (prép. C) et mieux débarrassées des électrolytes par dialyse (tableau XXIV. 1).

b) *L'action du couple ne semble pas s'exercer sur la phosphomonoestérase « alcaline ».* — Dans ce cas le Fe_{II} forme un complexe avec la cystéine et diminue simplement l'action inhibitrice du thiol ; le manganèse activateur de la phosphomonoestérase ne forme pas avec l'acide aminé une combinaison assez stable pour protéger de la même manière l'enzyme contre l'inhibition par le thiol (Tableau XXIV. 2).

TABLEAU XXIV. 1. – *Action du couple cystéine-Fe$_{II}$ sur la pyrophosphatase « alcaline » de diverses préparations de foie.*

Préparation A obtenue par extraction de poudre de foie à l'eau distillée pendant 1 heure.
Préparation B obtenue par la même extraction pendant 48 heures.
Préparation C obtenue par extraction pendant 1/4 heure à l'ammoniaque n/30 et dialysée 48 heures à pH = 7,4.
Hydrolyse enzymatique : 2 cm³ de solution M/10 de $P_2O_7Na_4$, 10 H_2O + 4 cm³ de solution tampon au véronal sodique + 1 cm³ de solution enzymatique + activateurs aux diverses concentrations indiquées. Volume total 10 cm³. pH = 7,4. Durée d'hydrolyse 2 heures à 37°.
Résultats en γ de P total libéré.

Préparation :	A						B						C			
Cystéine mol./litre	SO_4Fe mol./litre						SO_4Fe mol./litre						SO_4Fe mol./litre			
	0		1×10^{-3}		2×10^{-3}		0		1×10^{-3}		2×10^{-3}		0		1×10^{-3}	
	γ P libéré	p. 100 activation	γ P libéré	p. 100 activation	γ P libéré	p. 100 activation	γ P libéré	p. 100 activation	γ P libéré	p. 100 activation	γ P libéré	p. 100 activation	γ P libéré	p. 100 activation	γ P libéré	p. 100 activation
0	170	—	265	+ 55	325	+ 91	170	—	275	+ 61	276	+ 61	125	—	245	+ 96
6×10^{-4}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	115	— 8	340	+ 172
3×10^{-3}	170	0	265	+ 55	360	+ 111	165	0	350	+ 105	340	+ 100	—	—	—	—
6×10^{-3}	205	+ 20	260	+ 55	360	+ 111	190	+ 11	390	+ 129	405	+ 138	130	+ 4	475	+ 280
9×10^{-3}	220	+ 28	300	+ 76	435	+ 155	210	+ 23	445	+ 161	445	+ 161	—	—	—	—

TABLEAU XXIV. 2. — *Action de la cystéine sur la phosphomonoestérase « alcaline » de foie en la présence ou en l'absence de Fe^{++} ou de Mn^{++}.*

Préparation B dialysée pendant 24 heures à 37°. Hydrolyse avec β-glycérophosphate de Na.

Cystéine mol./litre	Sans cations		$SO_4Fe = 1 \times 10^{-3}M$		$SO_4Mn = 1 \times 10^{-3}M$	
	γ P libéré	p. 100 inhibition	γ P libéré	p. 100 inhibition	γ P libéré	p. 100 inhibition ou activ.
0	700		475	— 32	1675	+139
$1,5 \times 10^{-3}$	225	— 67	500	— 35	250	— 64
3×10^{-3}	150	— 78	385	— 46	225	— 67
3×10^{-3}	135	— 80	300	— 57	165	— 75

c) *L'activation de la pyrophosphatase par le couple cystéine-Fe_{II}* qui est très nette à pH = 7,4 est beaucoup plus réduite à pH = 5,6 ; elle est nulle à pH = 3,6.

TABLEAU XXIV. 3. — *Action du couple cystéine-Fe_{II} sur l'activité pyrophosphatasique de préparations hépatiques au pH optimum des trois pyrophosphatases.*

Préparation B dialysée 48 heures à pH = 7,4.

pH	SO_4Fe mol./litre	Cystéine mol./litre					
		0		6×10^{-4}		6×10^{-3}	
		γ P libéré	p. 100 activ.	γ P libéré	p. 100 activ.	γ P libéré	p. 100 activ.
3,6	0	100		100	0	100	0
	2×10^{-3}	100	0	100	0	100	0
5,6	0	120		120	0	120	0
	2×10^{-3}	120	0	120	0	265	+ 82
7,4	0	130		130	0	130	0
	2×10^{-3}	260	+ 100	290	+ 130	385	+ 192

d) *En outre, elle ne semble pas être propre aux préparations hépatiques ;* elle ne s'observe ni sur les extraits de reins ni sur ceux de muqueuse intestinale. Dans ce dernier cas la cystéine est faiblement inhibitrice et son action croissante en fonction de la concentration en thiol est contrebalancée par celle, activatrice par elle-même, de Fe et surtout de Zn à concentration six cents fois moindre.

TABLEAU XXIV. 4. — *Action du couple cystéine-Fe$_{II}$ sur la pyrophosphatase « alcaline » du rein.*

Préparation 1 : produit du type ALBERS purifié 4 fois par dissolution (1 p. 100) dans l'eau et précipitation à l'acétone 60 p. 100. Solution enzymatique à 1 p. 100 dialysée 24 heures contre solution de diéthyldithiocarbamate de Na M/1000, ensuite contre de l'eau à pH = 7,4.

Préparation 2 : produit obtenu par extraction à l'eau distillée pendant 48 heures de poudre de rein et dialyse pendant 48 heures à pH = 7,4.

Cystéine mol./litre	Préparation 1 : 0,2 cm³ sol. enzyme				Préparation 2 : 2 cm³ sol. enyyme			
	Sans Fe		$SO_4Fe = 1 \times 10^{-3} M$		Sans Fe		$SO_4Fe = 1 \times 10^{-3} M$	
	γ P libéré	p. 100 activ.	γ P libéré	p. 100 activ.	γ P libéré	p. 100 activ.	γ P libéré	p. 100 activ.
0	320	—	320	—	155	—	155	—
6×10^{-4}	290	— 9	310	— 3	160	+ 3	145	— 6
6×10^{-3}	270	— 16	260	— 18	150	— 3	150	— 3

TABLEAU XXIV. 5. — *Action de la cystéine sur la pyrophosphatase « alcaline » d'intestin en la présence ou en l'absence de Fe^{++} ou de Zn^{++}.*

Préparation obtenue par extraction à l'eau distillée pendant 48 heures de poudre d'intestin et dialyse pendant 48 heures à pH = 7,4.

Cations mol./litre	Cystéine mol./litre							
	0		$1,5 \times 10^{-3}$		3×10^{-3}		6×10^{-3}	
	γ P libéré	p. 100 activ.	γ P libéré	p. 100 activ.	γ P libéré	p. 100 activ.	γ P libéré	p. 100 activ.
0	382		315	— 17	275	— 28	255	— 33
$SO_4Fe : 1 \times 10^{-3}$	460	+ 20	420	+ 9	420	+ 9	360	— 6
$SO_4Zn : 1 \times 10^{-5}$	495	+ 29	420	+ 9	400	+ 5	350	— 8
$SO_4Zn : 5 \times 10^{-5}$	590	+ 54	590	+ 54	495	+ 29	495	+ 29

e) *Le complexe cystéine-Fe$_{II}$ présente une action qui lui est propre.* Lorsque l'un de ses constituants est remplacé, le thiol par le glutathion GSH ou la cystéine (tableau XXIV. 6), le métal par Mn ou Zn (tableau XXIV. 7), le complexe acide aminé-métal ne possède plus les propriétés du couple cystéine-Fe$_{II}$.

TABLEAU XXIV. 6. — *Action de Fe^{++} sur la pyrophosphatase « alcaline » du foie en la présence et en l'absence de glutathion GSH ou de cystine.*

Préparation B dialysée 24 heures à pH = 7,4.

SO_4Fe mol./litre	Glutathion mol./litre								Cystine mol./litre			
	0		1×10^{-3}		2×10^{-3}		5×10^{-3}		0		1×10^{-3}	
	γP libéré	p. 100 activ.	γP libéré	p. 100 activ.	γP libéré	p. 100 activ.	γP libéré	p. 100 activ.	γP libéré	p. 100 activ	γP libéré	p. 100 activ
0	285		270	— 5	285	0	280	— 1	320		410	+ 28
1×10^{-3}	330	+ 15	385	+ 35	400	+ 40	425	+ 45	350	+ 9	430	+ 34
2×10^{-3}	410	+ 43	400	+ 40	400	+ 40	405	+ 41	390	+ 21	470	+ 46
3×10^{-3}	400	+ 40	400	+ 40	425	+ 45	415	+ 43	420	+ 31	490	+ 53

TABLEAU XXIV. 7. — *Action de la cystéine sur la pyrophosphatase « alcaline » du foie, en la présence et en l'absence de Mn^{++} ou de Zn^{++}.*

Préparation B dialysée 24 heures à pH = 7,4.

Cations mol./litre	Cystéine mol /litre							
	0		6×10^{-3}		9×10^{-3}		12×10^{-3}	
	γP libéré	p. 100 activ.	γP libéré	p. 100 activ.	γP libéré	p. 100 activ.	γP libéré	p 100 activ.
0	260		280	+ 7	300	+ 15	310	+ 19
Zn : 1×10^{-5}	280	+ 7	280	+ 7	300	+ 15	310	+ 19
Zn : 1×10^{-4}	290	+ 11	280	+ 7	310	+ 19	325	+ 25
Zn : 1×10^{-3}	270	+ 3	270	+ 3	325	+ 25	335	+ 28
Mn : 1×10^{-3}	295	+ 13	365	+ 39	365	+ 39	385	+ 48
Mn : 2×10^{-3}	295	+ 13	345	+ 32	365	+ 39	425	+ 63
Mn : 3×10^{-3}	295	+ 13	345	+ 32	365	+ 39	440	+ 65

Le thiol mis en présence de Mn ou de Zn n'exerce qu'une coactivation très minime ou nulle ; on observe alors d'action synergique de la cystéine et du métal qu'à des concentrations relativement élevées de ceux-ci et cette action est très faible.

f) *L'action du couple cystéine-Fe est indépendante de l'état d'oxydation de l'enzyme.* L'incubation préalable de l'enzyme avec la cystéine au pH optimum d'action de la pyrophosphatase (pH = 7,4) en l'absence de sel de fer et de substrat, ne modifie pas l'action du couple activateur. De même le traitement de l'enzyme avec l'acide monoïodo acétique qui devrait en principe oxyder les groupements SH de l'enzyme ne change pas non plus la sensibilité de la phosphatase vis-à-vis du couple.

TABLEAU XXIV. 8. — *Action du couple cystéine-Fe$_{II}$ sur la pyrophosphatase « alcaline » de préparations hépatiques, préalablement traitées ou non par l'acide iodoacétique.*

SO_4Fe mol./litre	Traitée par l'acide iodoacétique				Non traitée à l'acide iodoacétique			
	Cystéine mol./litre				Cystéine mol./litre			
	0		3×10^{-3}		0		3×10^{-3}	
	γ P libéré	p. 100 activ.	γ P libéré	p. 100 activ.	γ P libéré	p. 100 activ	γ P libéré	p. 100 activ.
0	170		170	0	170	—	170	0
2×10^{-3}	255	+ 50	335	+ 97	255	+ 50	360	+111

3°) *Discussion des résultats.*

Les résultats qui viennent d'être exposés traduisent les faits suivants : le couple cystéine-fer semble activer spécifiquement la pyrophosphatase « alcaline » du foie, ses effets ne s'exerçant ni sur les pyrophosphatases « alcalines » de l'intestin et du rein, ni sur les enzymes « acides » isodynames, ni sur les phosphomonoestérases « alcalines ». Son action est due à l'association des deux constituants du système, le remplacement de Fe$_{II}$ par Mn ou Zn et celui de la cystéine par GSH ou la cystine, ne conduisant qu'à l'addition des effets propres à chacun de ceux-ci ou à une activation synergique très faible.

MASCHMAN explique l'action du couple cystéine-Fe$_{II}$ sur les peptidases en attribuant au thiol le rôle de réduire les déhydroapoenzymes en apoenzymes, seuls capables de fixer Fe$_{II}$, considéré comme le coferment métallique de ces enzymes. Il ne semble pas qu'il en soit ainsi puisque, d'après le même auteur, des réducteurs énergiques tels que l'acide ascorbique ou les sulfites alcalins ne peuvent remplacer le thiol. Dans le cas présent, le glutathion ne peut remplacer la cystéine ; en outre le traitement préalable de l'enzyme par la cystéine ou l'acide monoiodoacétique n'amène aucun changement dans les pourcentages d'activation ; ceux-ci devraient être modifiés si les faits observés étaient sous la dépendance des phénomènes d'oxydoréduction. Les effets activateurs du couple cystéine-fer ne relèvent pas des processus d'oxydoréduction [**434**, **438**].

On a expliqué également l'action des coactivateurs en admettant que les acides aminés forment des complexes avec des métaux gênant l'activité de l'enzyme. Une telle interprétation ne peut être retenue dans le cas actuel, l'activation observée étant plus prononcée après dialyse.

L'interprétation du phénomène de coactivation devrait être recherchée dans l'action directe du complexe activateur sur l'enzyme. En admettant que le métal fasse partie de l'enzyme, l'effet coactivateur de la cystéine consisterait à aider à la fixation du cation sur la phosphatase. Les métaux combinés à celle-ci doivent participer à son activité et les coactivateurs se comportent comme s'ils facilitaient leur mise en place dans une position privilégiée où ils peuvent exercer leur rôle dans la catalyse. En leur absence la fixation des cations par l'enzyme pourrait s'opérer de manière anarchique en dehors des positions privilégiées comme sur celles-ci ; il y aurait alors inhibition concurrente les métaux introduits dans le milieu gênant l'activité de ceux présents naturellement et dont l'enzyme n'est pas nécessairement saturé. Cette manière de voir permet d'interpréter l'action tour à tour inhibitrice ou activatrice de Zn sur la phosphomonoestérase « alcaline » de l'intestin en la présence ou en l'absence de coactivateurs peptidiques.

L'explication proposée suppose que le coactivateur n'intervient que lorsque le cation ne peut de lui-même accéder à une certaine position, résultant d'une isomérisation partielle de certains groupements de l'apoenzyme. Elle n'implique pas nécessairement que la spécificité observée soit absolue, celle-ci pouvant tenir davantage à l'état des préparations enzymatiques employées et aux conditions expérimentales qu'à la nature du complexe.

B. — Action des couples acides aminés-Mg sur la phosphomonoestérase « alcaline ».

Il existe en effet d'autres complexes activateurs. Hove, Elvejhem et Hart [207] ont montré que plusieurs acides aminés, des polypetides peuvent servir de coactivateurs à Zn. En outre le fait que le dialysat de la phosphatase rénale est plus efficace que le produit de son incinération renfermant Mg^{++} [131] relève sans doute de la même cause. En cherchant à généraliser les observations déjà faites nous avons essayé l'action d'autres complexes.

1°) *Matériel d'étude et technique.*

La solution enzymatique est obtenue par extraction aqueuse pendant une heure de la muqueuse fraîche d'intestin de chien, dialyse prolongée (quinze à quarante jours) à 37° contre de l'eau bidistillée chloroformée. On contrôle l'efficacité des opérations en déterminant l'activité phosphatasique des préparations à in-

tervalles réguliers. Lorsque celle-ci a perdu 95 p. 100 environ de sa valeur initiale, on arrête la dialyse et on procède à l'hydrolyse enzymatique.

Celle-ci est faite suivant les conditions habituelles, sur le β-glycérophosphate de Na.

2°) *Résultats.*

Les résultats les plus caractéristiques (tableau XXV) font ressortir que l'alanine, la cystéine, l'acide aspartique sont tous capables, à des degrés inégaux, d'exalter l'activation de la phosphomonoestérase « alcaline » par Mg. Le couplage de ces acides aminés avec Zn se montre pratiquement inefficace.

Tableau XXV. — *Action des couples acides aminés-Mg sur la phosphomonoestérase « alcaline » de l'intestin.* — 2 cm³ de solution m/10 de β-glycérophosphate de Na + 4 cm³ de solution tampon au véronal sodique + 0,5 cm³ d'enzyme + eau bidistillée q.s. 10 cm³. pH = 9,0. En la présence ou en l'absence d'effecteurs. 1 heure à 37°. Chiffres en γ de P total libéré.

Acide aminé M/l	Sans métal		$Mg = 1.10^{-3}$ M.		$Zn = 1.10^{-4}$ M	
	γ P	p. 100 activ.	γ P	p. 100 activ.	γ P	p. 100 activ.
0	54	—	88	+ 63	60	+ 11
l-alanine 2.10^{-3}	540	+ 900	800	+1351	590	+ 992
ac. l-aspartique 2.10^{-3}..	520	+ 862	590	+ 992	440	+ 714
l-cystéine 10^{-3}	1010	+1770	1230	+2117	730	+1251

3°) *Discussion des résultats.*

Le fait que des acides aminés les plus divers peuvent exalter l'activité de la phosphomonoestérase par Mg^{++} montre que la spécificité observée dans l'action du couple cystéine-Fe$_{II}$ sur la pyrophosphatase n'est qu'apparente et doit provenir des conditions expérimentales adoptées. Il est remarquable d'ailleurs que celles-ci ne nous aient pas permis de confirmer les résultats de Hove, Hart et Eevehjem.

Ces irrégularités proviennent sans doute du degré de dissociation de l'enzyme, de l'état d'isomérisation de certains groupements fonctionnels de l'apophosphatase. Elles traduisent une certaine disposition de celle-ci à fournir des complexes avec les couples activateurs.

C. — Action des couples alanine-métaux sur la phosphomonoestérase « alcaline ».

Nous avons observé d'ailleurs que l'action coactivatrice des acides aminés devient souvent irrégulière lorsque des préparations suffisamment purifiées ont été presque entièrement ou totalement inactivées par dialyse prolongée (perte de 98 - 100 p. 100 d'activité). La réactivation n'est alors possible et l'action des acides aminés régularisée, qu'après incubation préalable de l'enzyme à son pH optimum.

Nous avons utilisé pour ces essais un produit du type Albers, fractionné entre 40 et 55 p. 100 d'acétone. La solution enzymatique est dialysée à 37° pendant trois semaines, jusqu'à disparition de toute activité phosphatasique.

L'hydrolyse enzymatique, faite en la présence ou en l'absence d'effecteurs (alanine 10^{-2} M, Mg, Ca, Mn, Fe_{II}, Zn) est précédée ou non d'une incubation de 2 h. à 37°.

Tableau XXVI. — *Action des couples alanine-cations sur la phosphomonoestérase « alcaline ».*

Hydrolyse sans incubation : 2 cm³ de solution m/10 de β-glycérophosphate de Na + 4 cm³ de solution tampon au véronal sodique + 0,2 cm³ d'enzyme + eau bidistillée q.s. 10 cm³. En la présence ou en l'absence d'effecteurs. pH = 9,0. 5 minutes à 37°.

Hydrolyse avec incubation : 0,2 cm³ d'enzyme + 4 cm³ de solution tampon + eau bidistillée q.s. 8 cm³. En la présence ou en l'absence d'effecteurs. pH = 9,0. 2 h. à 37°. Ajouter ensuite 2 cm³ de solution m/10 de β-glycérophosphate de Na. 5 minutes à 37°.

Chiffres en mg. de P total libéré par minute et par mg. N.

Réactifs ajoutés (M/l)		Sans incubation		Avec incubation	
		Sans alanine	Alanine 10^{-2}M	Sans alanine	Alanine 10^{-2}M
Témoin.....		indosable	indosable	0.461	5.769
Acétate Mg..	10^{-2}	0.154	0.258	2.885	18.654
	5.10^{-2}	1.154	1.154	2.885	21.154
Acétate Ca..	1.10^{-3}	—	—	—	14.231
	1.10^{-2}	—	—	—	16.346
Sulfate Mn..	1.10^{-3}	—	—	—	15.385
	1.10^{-2}	—	—	—	13.846
Sulfate Fe_{II}..	1.10^{-7}	indosable	indosable	0.288	14.231
	1.10^{-6}	—	—	—	13.461
Sulfate Zn ...	1.10^{-7}	indosable	indosable	0.288	14.231
	1.10^{-6}	—	—	—	13.461

Les résultats obtenus (tableau XXVI) permettent les observations suivantes :

a) en l'absence de sels métalliques la réactivation partielle de la phosphatase est accrue par la présence de l'alanine.

b) en l'absence de cet acide aminé, Fe, Zn gênent même la réactivation partielle de l'enzyme.

c) l'alanine exalte au plus haut degré l'action de tous les cations essayés : Ca, Mg, Mn, Fe, Zn.

Discussion des résultats.

Dans les conditions expérimentales choisies, on n'observe plus cette spécificité qui paraît si étroite dans l'action du couple cystéine-Fe sur la pyrophosphatase « alcaline » et dans celle, moins absolue, des acides aminés-Mg rapportés plus haut. L'action du coactivateur ne devient nécessaire que lorsque l'enzyme a subi un certain traitement qui devait sans doute modifier plus ou moins profondément l'état de l'apophosphatase. Dans le cas où l'enzyme est complètement inactivé par dissociation provoquée à la suite d'une longue dialyse, l'influence des cations ne peut plus s'exercer qu'à l'aide et par l'intermédiaire des acides aminés. Il n'existe plus alors de spécificité entre le formateur de complexe et les cations. Celle-ci ne se produit sans doute qu'au cas où le traitement subi par l'enzyme n'amène que des modifications limitées, provoquant la « mise hors de circuit » d'un nombre restreint de cations ; une inactivation complète par « dissociation généralisée » de tous les cations exige pour la reconstitution de l'holophosphatase la remise en place de ces derniers et l'intervention du coactivateur en faveur de tous les métaux.

CONCLUSIONS.

Les résultats que nous avons observés joints aux données de Hove, Hart et Elvehjem font ressortir le rôle important des acides aminés dans l'activité des phosphatases. Ils expliquent maintes irrégularités observées à la fois dans l'influence des acides aminés encore récemment contestée par Albers [7] et dans celles de certains cations qui se montrent tantôt activateurs, tantôt inhibiteurs.

Les recherches que nous poursuivons sur les phosphatases étaient en plein développement lorsque nous sont parvenus les travaux de Maschmann sur les peptidases [294] et ceux de Warburg sur la zymohexase [443] montrant la participation de la cystéine à la réactivation des deux enzymes.

La comparaison des résultats obtenus par ces auteurs et les nôtres fait ressortir la généralité du phénomène et l'importance des coactivateurs. Le rôle de ceux-ci ne semble pas particulier à un enzyme mais suffisamment répété pour qu'on soit tenté

de le considérer du point de vue des réactions enzymatiques générales.

La recherche du mode d'action des coactivateurs est susceptible en outre de faire régulariser et d'expliquer l'action — parfois contestée — de certains acides aminés sur l'amylase [401, 402, 403], l'uréase [373, 374, 412], la lipase [115].

Notre point de vue vient de trouver sa première confirmation dans l'un de nos récents travaux. En collaboration avec J. Roche et A. Dziri nous avons en effet établi que la cystéine dont l'action activatrice sur l'amylase pancréatique a été mise en évidence par Sherman exalte l'action de Mg et de Zn sur cet enzyme.

*
**

III. — Interchangeabilité des cations activateurs.

L'établissement des conditions optima d'activation des phosphatases est indispensable à la compréhension des nombreuses irrégularités observées dans l'activation de ces enzymes. Nous avons étudié successivement l'existence réelle des lyo et desmoenzymes et le rôle important des effecteurs naturels — ions inclus dans l'enzyme ou coactivateurs organiques — dont l'élimination au cours de la purification modifie les caractères des phosphatases. De ce fait, il nous est plus facile d'exposer les nombreuses contradictions, qu'avec tant d'autres chercheurs, nous avons rencontrées dans l'individualisation des phosphatases isodynames. La connaissance des véritables conditions d'action des effecteurs permet en tous cas de préciser avec plus de sécurité le caractère spécifique de ces derniers vis-à-vis de chaque enzyme.

A. — Action des cations sur les phosphatases « acides et alcalines ».

Parmi les caractères qui ont servi à définir les phosphatases « isodynames » le comportement de celles-ci à l'égard des cations, particulièrement du Mg, est considéré comme l'un des plus importants. La phosphatase alcaline (pH = 9) est activée par ce métal, comme « l'α » glycérophosphatase (pH = 6,0) ; la phosphatase « peu acide » (pH = 5,6) est indifférente à Mg, lequel inhibe fortement la phosphatase « très acide » (pH = 3,6 - 4). Nous avons comparé l'action des ions Mg^{++} et Ca^{++} sur les phosphatases « alcalines et acides », espérant préciser ainsi les caractères spécifiques de ces enzymes.

1°) *Action de Mg^{++} et de Ca^{++} sur les phosphatases « alcalines ».*

Les résultats que nous avons exposés depuis le début de ce chapitre ont montré que ces deux cations activent à un très haut degré la phosphomonoestérase « alcaline ». Ceux dont nous présenterons le détail plus loin (tableau XXXIII) confirment le même fait pour les pyrophosphatases.

Il ne semble pas nécessaire d'insister sur le cas de Mg^{++}. L'action de celui-ci sur les phosphatases alcalines est confirmée par tous les travaux ; seul le pourcentage d'action obtenu varie d'un auteur à un autre et dépend du degré de purification de l'enzyme et des conditions de son action.

L'efficacité du calcium est parfois contestée ; nous avons en effet décrit plus haut des cas où ce métal est inhibiteur en raison de son action concurrente vis-à-vis d'autres cations, en particulier de Mg, surtout lorsque l'enzyme est déjà saturé en constituants métalliques.

L'emploi d'enzymes suffisamment purifiés et débarrassés des métaux qui y sont naturellement inclus et le choix des conditions expérimentales qui rendent possible la fixation des cations sur les phosphatases permettent d'activer celles-ci par Mg^{++} et Ca^{++} dans des proportions considérables.

2°) *Action de Mg^{++} et Ca^{++} sur les phosphatases « acides ».*

Cette étude a été faite sur des matériels biologiques divers (Basidiomycètes, graines de soja, d'amandes douces), de degré de purification différente.

a) *Action du magnésium sur les phosphatases « acides » de Basidiomycètes.* — α) Extraits bruts. — 1) Inhibition des phosphomonoestérases « acides ». — Les préparations enzymatiques utilisées sont de deux types : l'une est obtenue par macération de champignons (*Armillaria mella*) dans trois parties d'eau pendant trois heures, suivie d'une dialyse de trois jours contre de l'eau distillée (préparation A) ; l'autre est un produit du type Albers, non purifié et dialysé trois jours (B).

L'hydrolyse dure une heure en la présence ou en l'absence de Mg (10^{-5} à 10^{-2} m/l). Dans les deux préparations on observe une forte inhibition des phosphomonoestérases, plus forte à pH = 3,2 qu'à pH = 5 (tableau XXVII et fig. 2).

2) Signification cinétique de l'inhibition par Mg. - Nous avons essayé d'étudier le mécanisme d'inhibtion par Mg des extraits aqueux de champignons (Lactaires délicieux, sclérodermes). Nous avons examiné en particulier l'influence de ce

cation en présence des ions PO_4^{---} et AsO_4^{---} (arséniate de Na) ; nous avons ensuite déterminé le rôle de Mg dans les rapports d'affinité de l'enzyme avec le substrat.

TABLEAU XXVII. — *Action comparée du magnésium à diverses concentrations sur les deux phosphomonoestérases « acides » de Basidiomycètes.* — 2 cm³ de solution m/10 de β-glycérophosphate de Na + 2 cm³ de solution tampon au citrate disodique + 1 cm³ d'enzyme. pH = 3,2 et 5. 1 heure à 37°. Chiffres en γ de P libéré par minute.

Mg (M/l)	Préparation de type A				Préparation de type B			
	pH = 3,2		pH = 5		pH = 3,2		pH = 5	
	γ P par minute	p. 100 perte d'activité	γ P par minute	p. 100 perte d'activité	γ P par minute	p. 100 perte d'activité	γ P par minute	p. 100 perte d'activité
0	35	0	32	0	31	0	34	0
5.10^{-5}	31	12	32	0	31	0	34	0
1.10^{-4}	26	25	32	0	27	10	32	4
5.10^{-4}	16	55	31	3	19	39	31	8
1.10^{-3}	9	72	30	5	13	57	30	11
1.10^{-2}	traces	totale	28	11	4	85	18	16

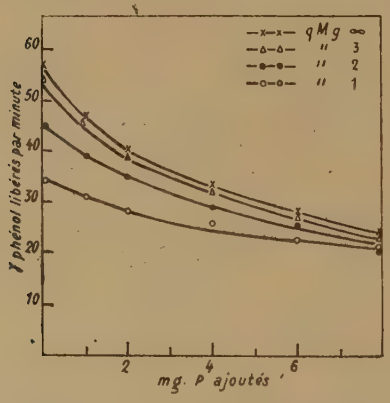


FIGURE 13. — *Inhibition par Mg^{++}.* (qMg = , 1, 2 et 3) *de l'action défavorable des phosphates sur l'hydrolyse du phénylphosphate de sodium à pH = 5,4 par la phosphomonoestérase de* Lactarius deliciosus.

Abscisses : mg P ajoutés dans 10 cm³.

Ordonnées : γ phénol libérés par minute.

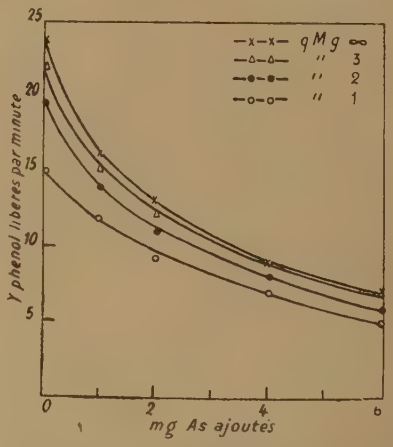


FIGURE 14. — *Inhitbition par Mg de l'action défavorable des arséniates sur l'hydrolyse du phénylphosphate de sodium à pH = 5,4 par la phosphomonoestérase de Scléroderme.*

Abscisses : mg. As ajoutés dans 10 cm³.

Ordonnées : γ phénol libérés par minute.

Pour permettre le dosage de l'activité phosphatasique en présence de quantités importantes d'ions PO_4^{---}, nous avons choisi

comme substrat le phénylphosphate de Na, préparé suivant KING et NICHOLSON [241], et dosé le phénol libéré à la fin de l'hydrolyse. Celle-ci est opérée au moyen de 2 cm³ de phénylphosphate de Na m/10 + 2 cm³ de citrate disodique m/10 + 1 cm³ d'enzyme + eau distillée q.s. 10 cm³ à pH = 5,4 à 37° pendant 1 h. Mg^{++} et P^{---} sont ajoutés sous forme de sulfate de Mg et de PO_4H_2K. Le pH est contrôlé au début et à la fin de l'expérience. L'activité enzymatique a été mesurée par le dosage de phénol libéré au moyen de la technique de FOLLEY et KAY [142]. On prélève en fin d'expérience 1 cm³ du mélange que l'on additionne de 2 cm³ du réactif de FOLIN et CIOCALTEU dilué au 1/3. On ajoute 2 cm³ de solution à 14 p. 100 de CO_3Na_2 et on complète à 20 cm³ avec de l'eau distillée. On porte à 37° pendant 40 minutes et on détermine au photomètre de PULFRICH l'intensité de la coloration bleue obtenue. On rapporte celle-ci à une courbe étalon établie sur une solution de phénol sec. Dans les conditions où nous nous sommes placés la solution enzymatique, seule, ne donne qu'une coloration insignifiante. Les résultats objectivés dans la figure 13 montrent que l'inhibition exercée par l'ion PO_4^{---} s'exerce à toutes les concentrations en sel de Mg (1), la pente des courbes devient de plus en plus faible au fur et à mesure que la concentration en Mg augmente.

L'ion Mg empêche donc l'action inhibitrice des phosphates, indépendamment de son action inhibitrice propre vis-à-vis de la phosphomonoestérase. Le remplacement des ions PO_4^{---} par des ions AsO_4^{---} fournit les mêmes résultats (fig. 14). L'ion Mg gêne l'action inhibitrice d'AsO_4 comme celles de PO_4 (2).

Nos résultats confirment ainsi l'interprétation de ERDTMAN [131] selon laquelle Mg protège la phosphatase rénale (pH opt. = 9) contre l'action inhibitrice de PO_4^{---}. Cette action qui relève sans doute de la formation de nouveaux équilibres salins entre PO_4^{---}, Mg^{++}, Na^{+}, esters phosphoriques, enzymes, s'exerce indépendamment de l'action inhibitrice propre de Mg sur la phosphatase. Celle-ci est basée sur une modification de l'affinité de l'enzyme pour le substrat. En opposant à des quantités constantes d'enzyme (1 cm³) des quantités croissantes de glycéro-

(1) Les concentrations en [Mg] ont été exprimées selon la notation proposée par KAY, à savoir qMg = — log [mg] ; par ex. [Mg] = M/1.000 correspondant à qMg = 3. Le symbole qMg = désigne les concentrations en Mg dans les milieux auxquels aucun sel de Mg n'a été ajouté.

(2) Nous avons vérifié au cours de ces recherches, la difficulté de dosage des phosphates en présence des arséniates au moyen du réactif réducteur amino-naphtol-sulfonique signalés par BARRENSCHEEN [51]. La méthode de dosage de LOHMANN [285] est alors inapplicable, mais la réduction préalable de l'ion ASO_4 par le sulfite de Na avant la formation du complexe molybdique (BARRENSCHEEN) permet le dosage de PO_4^{---} par la méthode de BRIGGS (erreur relative : 5 p. 100).

TABLEAU XXVIII. — *Vitesses initiales* (γ P libéré par minute) *de l'hydrolyse du β-glycérophosphate de sodium par les phosphatases de Lactaire délicieux* (pH = 5,4) *et de la muqueuse intestinale* (pH = 9,0) *à diverses concentrations en substrat* [S] *en l'absence de* Mg^{++} (q Mg =) *ou en la présence de cet ion* (q Mg = 3,2 et 1).

Concentration en substrat : — log [S]	Vitesse initiale de l'hydrolyse (γ P par minute) en présence de :			
	q Mg = ∞	q Mg = 3	q Mg = 2	q Mg = 1
A. — Phosphatase de Lactaire (pH = 5,4)				
3	3,5	—	2,8	—
2,60	7,6	—	5,6	4,8
2,50	8,8	—	6,0	5,0
2,30	17,0	—	11,2	6,0
2,00	28,0	—	19,0	8,0
1,80	30,0	—	22,0	12,0
1,70	34,0	—	24,0	12,5
1,60	25,0	—	25,0	13,0
1,53	36,0	—	26,5	14,0
1,40	33,0	—	24,0	14,0
1,30	30,0	—	22,0	13,0
Affinité K_M =	158	—	126	80
B. — Phosphatase de la muqueuse intestinale (pH = 9,0)				
2,60	37,0	47,0	53,0	—
2,50	40,0	53,0	62,0	—
2,30	52,0	64,0	74,0	—
2,00	73,0	82,0	95,0	—
1,80	87,0	98,0	108,0	—
1,70	98,0	103,0	—	—
1,60	99,0	—	123,0	—
1,53	101,0	110,0	123,0	—
Affinité K_M =	107	135	172	—

phosphate de Na et de sulfate de Mg, nous avons mesuré la vitesse initiale de la réaction, en dosant le P libéré. Les résultats portés dans le tableau XXVIII ont permis de construire les courbes 15 et 16.

On observe que Mg^{++} diminue l'affinité de l'enzyme à pH optimum 5,4 ce qui explique l'inhibition subie par celle-ci en présence des sels de Mg.

Les essais précédents répétés sur la phosphomonoestérase alcaline montrent que le même métal, tout en protégeant l'enzyme contre l'action inhibitrice des ions $PO_4^{\equiv}$ et $AsO_4^{\equiv}$ augmente l'affinité de la phosphatase pour le glycérophosphate.

On est tenté de conclure de ces résultats que le magnésium joue un rôle opposé dans les phosphatases « acides » et « alcalines » et que la spécificité réside dans des groupements actifs.

Cependant on peut concevoir que l'addition de Mg à la préparation de phosphomonoestérase « acide » déjà saturée de ce métal, détermine une fixation anarchique de Mg sur l'enzyme donnant naissance à de nouveaux complexes protéino-métalliques dont l'affinité pour le substrat est diminuée.

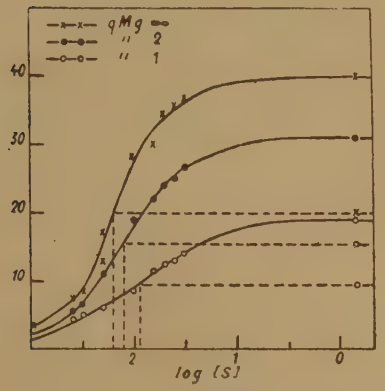


FIGURE 15. — *Vitesses initiales* (mesurées en γ P libéré par minute) *de l'hydrolyse du β-glycérophosphate de sodium par la phosphatase du Lactaire à pH = 5,4 à diverses concentration en substrat* [S].
Abscisses : — log [S].
Ordonnées : γ P libérés par minute.

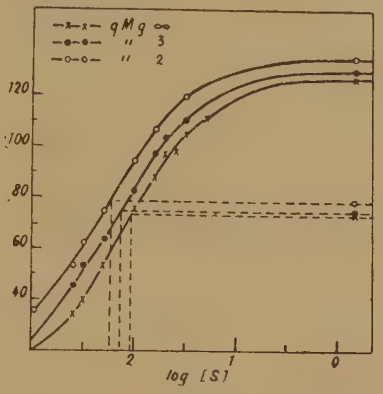


FIGURE 16. — *Vitesses initiales* (mesurées en γ P libéré par minute) *de l'hydrolyse du β-glycérophosphate de sodium par la phosphatase de l'intestin à pH = 9,0 à diverses concentrations en substrat* [S].
Abscisses : — log [S].
Ordonnées : γ P libérés par minute.

β) EXTRAITS PURIFIÉS. — L'action de Mg sur des préparations de Basidiomycètes purifiées semble confirmer ce point de vue. Des *Boletus edulis* traités par la technique d'ALBERS ont fourni un produit qui a été dissous dans l'eau et fractionné à l'acétone

TABLEAU XXIX. — *Action de Mg^{++} sur les préparations purifiées de Basidiomycètes, à pH = 3,6 et 5,6.* — 2 cm³ de solution m/10 de β-glycérophosphate de Na + 4 cm³ tampon acétoacétique + 0,2 cm³ d'enzyme + eau bidistillée q.s. 10 cm³. En la présence ou en l'absence d'acétate de Mg. pH = 3,6 et 5,6. 5 minutes à 37°. Chiffres en γ de P total libéré par minute et par mg. de N.

Acétate Mg M/l	pH = 3,6	pH = 5,6
Témoin sans Mg	7,418	6,815
» » »	7,490	6,850
5.10^{-4}	7,418	6,880
1.10^{-3}	7,500	6,830
5.10^{-3}	7,430	6,850
1.10^{-2}	7,450	6,830

froide. Le produit précipitant entre une teneur en acétone de 35 - 60 p. 100 est à nouveau fractionné 4 fois de la même manière. La solution enzymatique est ensuite dialysée à 37° contre de l'eau bidistillée pendant près de deux mois ; concentrée sous vide à 35° elle est fractionnée encore une fois à l'acétone.

L'enzyme obtenu présente une très haute activité phosphomonoestérasique. Comme le montre le tableau XXIX, il se révèle alors complètement indifférent à l'action de Mg.

b) *Action de Mg^{++} et de Ca^{++} sur les phosphomonoestérases « acides » des graines de soja.* — Des extraits de graines de soja dialysées sont inhibées par Mg plus fortement à pH = 3.6 qu'à pH = 5,6 (tableau XXX). L'adsorption sur kaolin ne modifie pas leur comportement ; les ions Ca^{++} par contre n'exercent aucune influence sur les préparations de soja.

TABLEAU XXX. — *Action de diverses concentrations de Mg^{++} et Ca^{++} sur les diverses préparations de soja aux pH = 3,6 et 5,6.* — 2 cm³ de solution m/10 de β-glycérophosphate de Na + 4 cm³ de solution tampon acétoacétique + 1 cm³ (prép. A) ou 2 cm³ (prép. B) d'enzyme + eau distillée q.s. 10 cm³. pH = 3,6 et 5,6. En la présence ou en l'absence d'effecteurs (acétates de Ca et de Mg). 1 h. à 37°.
Chiffres en γ de P total dosé.

Sel (mol /litre)	A. Avant adsorption				B. Après adsorption			
	pH = 3,6		pH = 5,6		pH = 3,6		pH = 5,6	
	Mg	Ca	Mg	Ca	Mg	Ca	Mg	Ca
0	385	385	495	495	110	110	231	231
5.10^{-3}	308	385	495	495	35	110	231	231
1.10^{-2}	253	385	495	480	25	110	231	231
1.10^{-1}	155	385	396	—	traces		154	—

Existe-t-il des phosphatases de soja différentes de celles de ces champignons ? Il est peut-être plus simple de penser que l'adsorption qui permet certaines séparations ne réalise pas une élimination suffisante des cations contenus dans les préparations examinées. Cette opinion est renforcée par des variations observées avec les extraits d'amandes douces.

c) *Action de Mg^{++} et de Ca^{++} sur les phosphomonoestérases « acides » des graines d'amandes douces.* — COURTOIS a montré que la phosphomonoestérase contenue dans l'émulsine d'amande douce de pH optimum = 5,6 est légèrement inhibée par le magnésium. Nous avons observé que des émulsines d'amandes

fraîches ou sèches sont activées par Mg^{++} et surtout par Ca^{++} à pH = 3,6 avant comme après adsorption sur alumine. L'activation par le dernier cation peut dépasser 200 p. 100. Mg inhibe légèrement à pH = 5,6 tandis que Ca est sans action à ce pH.

TABLEAU XXXI. — *Action de diverses concentrations de Ca^{++} sur l'activité phosphatasique des émulsines vis-à-vis du β-glycérophosphate de Na aux pH = 3,6 et 5,6.* — 2 cm³ de solution m/10 de β-glycérophosphate de Na + 4 cm³ de solution au tampon acétoacétique + 1 cm³ de solution d'émulsine (1 p. 100) + eau distillée q.s. 10 cm³. pH = 3,6 et 5,6. En la présence ou en l'absence d'acétate de Ca. 1 h. à 37.
Chiffres en γ de P total libéré.

Acétate Ca mol./litre	Préparation I				Préparation VII			
	pH = 3,6		pH = 5,6		pH = 3,6		pH = 5,6	
	γ P	p. 100 d'activation	γ P	p. 100 d'activation	γ P	p. 100 d'activation	γ P	p. 100 d'activation
0	138	0	1368	0	77	0	393	0
5.10^{-4}	138	0	1368	0	77	0	393	0
1.10^{-3}	198	+ 43	1360	0	91	+ 18	393	0
5.10^{-3}	276	+100	1368	0	140	+ 80	393	0
1.10^{-2}	444	+221	1350	— 1	165	+114	393	0

d) *Discussion des résultats.* — L'ensemble des résultats fait ressortir de très grandes variations dans le comportement des

TABLEAU XXXII. — *Action de Mg^{++} sur diverses préparations d'amande douce en fonction du pH.* — 2 cm³ de solution m/10 de β-glycérophosphate de Na + 4 cm³ de tampon acétoacétique ou de véronal sodique + 2 cm³ d'enzyme + eau distillée q.s. 10 cm³. En la présence ou en l'absence de Mg^{++}. Durée de l'hydolyse : 1 h. pour les essais 1 et 3 et 8 h. pour 2 et 4.
Chiffres en γ de P total dosé.

pH	Essai A		Essai B		Essai C.			
	1. Reste d'adsorption		2 Reste d'adsorption		3. Eluat		4. Reste d'adsorption	
	0 Mg	1.10^{-2}M, Mg	0 Mg	1.10^{-2}M, Mg	0 Mg	1.10^{-2}M, Mg	0 Mg	1.10^{-2}M, Mg
3,6	56	70	152	528	360	444	336	534
3,8	60	75						
4	69	89	444	642	642	696	588	696
4,3	97	93	672	716	1005	978	756	756
4,6	116	107	726	726	1146	1116	810	810
4,7	—	—	756	756	1230	1176	840	840
5	125	112	840	820	1254	1200	810	780
5,6	149	139	840	820	1314	1278	810	780
6,2	51	51	—	—	—	—	—	—

phosphatases vis-à-vis de Mg et de Ca à pH = 3,6 et 5,6, considérés comme pH optima de deux enzymes spécifiques.

L'expérience a prouvé cependant que, dans le cas des champignons, une purification très poussée modifie profondément le caractère de l'enzyme. En outre l'activation des préparations d'émulsine par Ca^{++} et Mg^{++} à pH = 3,6 rapproche cette phosphatase de la phosphomonoestérase « alcaline ». De telles variations ne sont d'ailleurs pas absentes avec cette dernière, laquelle demeure indifférente vis-à-vis de Mg ou subit une certaine inactivation en présence de Ca lorsque l'enzyme n'est pas suffisamment purifié.

Conclusions. — Les différences observées entre les diverses phosphatases « acides » et les phosphatases « alcalines » semblent provenir d'une part de la stabilité à pH acide des complexes protéino métalliques des premières et d'autre part de la teneur des préparations en métaux. Nous avons déjà signalé l'importance de cette stabilité dans l'action du pH sur les phosphatases, stabilité dont dépend la dissociation des constituants métalliques. Il est d'ailleurs permis de supposer que la capacité de former des complexes est inégale pour les diverses protéines, l'addition de métaux à celles qui se saturent le plus rapidement en cations devant déterminer plus facilement la formation de nouvelles combinaisons protéino-métalliques inactives. Cette interprétation fait ressortir l'analogie qui existe entre l'inhibition par Mg des phosphatases acides et celle exercée par divers cations sur les phosphatases alcalines lorsque celles-ci ne sont pas purifiées ou sont chargées artificiellement de métaux. Elle fait disparaître généralement les différences attribuées aux groupements actifs des phosphatases « acides » et « alcalines » et qui ne semblent pas compatibles avec la fonction catalytique commune de ces deux enzymes.

B. — Action des cations sur les phosphomonoestérases et les pyrophosphatases.

Jusqu'à ces derniers temps, seule l'action du Mg sur les phosphatases était bien connue ; celle de Ca et de Mn se prêtait encore à bien des contradictions ; quant aux ions Fe^{++} et Zn^{++} leur participation à l'activité des phosphatases ne prenait jour qu'avec les travaux de Cloetens et de Bamann. Seul ce dernier auteur a entrepris une étude d'ensemble de l'action des cations sur les phosphomonoestérases, pyrophosphatases, polyphosphatases, métaphosphatases. Il y a quelque intérêt à rapprocher des

résultats obtenus avec des protocoles expérimentaux parfois très semblables mais appliqués à un matériel biologique différent.

1°) *Matériel d'étude et technique.*

De la muqueuse intestinale de chien fraîche est traitée par trois parties d'eau distillée pendant une heure ; l'extrait est ensuite dialysé à 37° pendant sept jours contre de l'eau distillée puis pendant quatre jours contre une solution 10^{-3} M αα' dipyridyl et enfin pendant quinze jours contre de l'eau bidistillée.

L'hydrolyse est faite dans les conditions habituelles à pH = 9 pour la phosphomonoestérase et à pH = 8,6 pour la pyrophosphatase.

2°) *Résultats.*

Indépendamment de l'augmentation d'activité après dialyse prolongée contre des formateurs de complexes, on peut noter

Tableau XXXIII. — *Action des cations sur la phosphomonoestérase et la pyrophosphatase « alcalines » d'intestin et de foie.* — 2 cm³ de solution m/10 de β-glycérophosphate ou de pyrophosphate de Na + 4 cm³ de solution tampon au véronal sodique + 0,5 cm³ d'enzyme + eau distillée q.s. 10 cm³. En la présence ou en l'absence d'acétate de Ca, de sulfates Mg, Mn, Fe, Zn. 1 h. à 37°.

Concentration saline M/l	Phosphomonoestérase pH = 9,0									
	γ P total libéré					p. 100 d'activation (+) ou d'inhibition (—)				
	Ca	Mg	Mn	Fe	Zn	Ca	Mg	Mn	Fe	Zn
2.10^{-5}	—	—	—	—	39	—	—	—	—	0
5.10^{-5}	—	—	—	32	27	—	—	—	— 5	—21
1.10^{-4}	—	—	—	14	24	—	—	—	—45	—31
5.10^{-4}	535	1364	2178	—	21	+1561	+3911	+6306	—	—38
1.10^{-3}	630	2260	2178	—	—	+1752	+6373	+6306	—	—
5.10^{-3}	866	2640	1848	—	—	+2447	+7664	+5335	—	—
1.10^{-2}	780	2816	1694	—	—	+1900	+8182	+4882	—	—
Témoin : sans métal = 34						0				
	Pyrophosphatase pH = 8,6									
	γ P total libéré					p. 100 d'activation (+) ou d'inhibition (—)				
2.10^{-5}	—	—	—	94	120	—	—	—	0	+17
5.10^{-5}	—	—	—	94	120	—	—	—	0	+17
1.10^{-4}	—	—	—	165	124	—	—	—	+75	+21
5.10^{-4}	94	94	94	160	124	0	0	0	+70	+21
1.10^{-3}	94	160	120	—	—	0	+ 70	+ 17	—	
5.10^{-3}	118	240	166	—	—	+ 25	+ 155	+ 76	—	
1.10^{-2}	140	360	160	—	—	+ 25	+ 283	+ 70	—	
Témoin : sans métal = 94						0				

que les cations examinés : Ca, Mg, Mn, Fe, Zn, activent tous la pyrophosphatase tandis que les trois premiers seuls activent la phosphomonoestérase et les deux derniers l'inhibent.

Ces résultats semblent être en contradiction avec ceux de Bamann pour lequel, entre autres, Fe^{++} active fortement toutes les phosphatases et avec ceux de Cloetens qui considère Zn comme un des coferments métalliques de la phosphomonoestérase. Ils sont aussi différents de ceux que nous avons rapportés plus haut prouvant qu'on peut réactiver une phosphomonoestérase complètement inactivée par les cations Ca, Mg, Mn, Fe, Zn.

En réalité les écarts observés s'expliquent facilement par la diversité du degré de purification des produits utilisés et les conditions qui président à l'hydrolyse enzymatique. Il est certain que le produit le plus pur est aussi le plus facilement activable ; en outre la méthode d'incubation qui permet la mise en place de cations sur l'apophosphatase est une condition indispensable à l'activation ou à la réactivation.

Conclusions. — Toutes choses étant égales par ailleurs, les phosphomonoestérases admettent les mêmes activateurs que les pyrophosphatases. Le fait qui mérite d'être mis en relief, au terme de cette étude, est l'*interchangeabilité des cations* : Ca, Mg, Mn, Fe, Zn. Sans doute les conditions de leur action changent : leurs concentrations optima sont différentes, leur affinité pour l'enzyme est inégale, les pourcentages d'activation sont divers. Un fait est indéniable : des cations chimiquement différents participent tous à l'activité de catalyseurs fonctionnellement différents. Une complète absence de spécificité des cations examinés vis-à-vis non seulement des pyrophosphatases et des phosphomonoestérases « acides ou alcalines » mais également d'autres enzymes à coferments métalliques dissociables ou présumés tels, ne permet pas d'attribuer directement à ces cations des activités catalytiques aussi différentes que celles de l'énolase, de la zymohexase, de la carboxylase, de l'arginase, des peptidases.

CONCLUSIONS.

La définition des phosphatases spécifiques d'après leurs caractères d'activation et d'inhibition ne peut être établie que si les conditions d'action des effecteurs sont bien connues. Jusqu'à présent elle a été souvent faussée par l'interprétation prématurée d'observations fragmentaires faites sur des enzymes insuffisamment purifiés. La distinction des lyo et des desmo-

phosphatases possédant des groupements actifs diversement situés, résulte précisément d'une explication trop unilatérale des caractères d'activation de ces enzymes. En accordant une importance exagérée aux colloïdes qui les accompagnent dans des préparations insuffisamment débarrassées d'effecteurs naturels, on a négligé l'intervention de ceux-ci dans le comportement des phosphatases.

L'élimination de certains effecteurs qui agissent synergiquement avec des cations modifie également les caractères de ces enzymes et, par ailleurs, le rôle des coactivateurs mérite aussi d'être souligné. En premier lieu la présence de ces corps constitue un facteur important dans la réactivation des phosphatases ; en outre leur action semble relever d'un mécanisme réactionnel qui n'est pas particulier à celles-ci mais commun à un certain nombre d'enzymes.

Les conditions d'activation, surtout de réactivation des enzymes ne sont pas simples ; elles tiennent à la stabilité des complexes protéinométalliques, des modifications profondes de l'apoenzyme à la suite des traitements subis par lui (pH, dialyse). Ces deux facteurs expliquent que des phosphatases « acides » présentent parfois des différences avec les phosphatases « alcalines » et que les phosphomonoestérases n'aient pas les mêmes activateurs que les pyrophosphatases. Cependant à l'aide d'enzymes suffisamment purifiés et d'un choix judicieux des conditions d'hydrolyse, permettant aux cations de se fixer sur l'enzyme, on peut observer que ceux-ci peuvent, à divers degrés, activer aussi bien les phosphomonoestérases que les pyrophosphatases, les enzymes de pH optimum alcalin que ceux de pH optimum acide. Les phosphatases des extraits aqueux de Basidiomycètes sont inhibées par Mg à pH = 3,6 et 5,6 ; mais elles ne le sont plus après purification ; et dans les extraits d'amandes douces elles sont au contraire activées par Ca^{++} et par Mg^{++}. Ainsi l'action inhibitrice de Mg considérée jusqu'à présent comme l'un des caractères spécifiques de la phosphatase « très acide » ne peut plus être retenue et la différence réelle qui sépare les divers enzymes « isodynames » ne réside plus que dans leurs pH optima d'action.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

LA SPÉCIFICITÉ DES PHOSPHATASES DANS LE CADRE GÉNÉRAL DE L'ENZYMOLOGIE.

On a admis jusqu'à présent l'existence de nombreux enzymes spécifiques de divers dérivés phosphoriques ; mono et diesters orthophosphoriques, pyro, poly, métaphosphates. Divers groupes de phosphatases de même spécificité comprennent des enzymes isodynames possédant chacun un pH optimum particulier et des effecteurs propres. On distingue dans le groupe des phosphomonoestérases quatre types d'enzyme et dans celui des pyrophosphatases, trois. La signification de ces diverses spécificités et la nature de leur support matériel constituent l'objet de diverses recherches dont les résultats paraissent contradictoires. La nature purement métallique attribuée par les uns au coferment de la phosphomonoestérase « alcaline » est mise en doute par les autres ; elle ne justifie d'ailleurs pas le caractère présumé interchangeable des coferments, car les phosphatases « alcalines » sont activables par des cations qui inhibent les phosphatases « acides ».

Les recherches que nous avons entreprises visent à expliquer ces diverses contradictions et à dégager la signification générale de la spécificité des caractères de diverses phosphatases.

1. L'emploi des méthodes diverses de séparation et de purification nous a permis d'obtenir des préparations spécifiques, les unes des monoesters orthophosphoriques, les autres des pyrophosphates. Cette spécificité réside d'abord dans la stabilité différente des holophosphatases dont la dissociation se produisant à des vitesses inégales, à certains pH, permet de séparer les deux activités enzymatiques. Elle réside aussi dans la nature des apoenzymes protéiques, sans doute très voisins, mais qui peuvent être séparés par précipitation ou cristallisation de l'un d'eux. Le deuxième constituant, commun aux phosphomonoestérases et aux

pyrophosphatases, est très vraisemblablement un métal divalent : Ca, Mg, Mn, Fe, Zn (et peut-être quelques autres).

Le caractère banal, interchangeable de ces métaux, se trouvant dans la plupart des enzymes à coferments métalliques dissociables ou présumés tels, rend difficile d'admettre qu'ils puissent constituer le support matériel de la spécificité, à la fois de la phosphomonoestérase, de la pyrophosphatase comme de l'énolase, de la zymohexase, de la carboxylase, de l'anhydrase, de l'arginase et des peptidases. L'énergie requise dans des réactions très différentes : dismutation d'un hexose, isomérisation et décarboxylation des acides, anhydrisation des acides carboniques et phosphoriques, hydrolyse des dérivés peptidiques et des esters phosphoriques, doit être fournie par des systèmes catalytiques très divers et qui ne peuvent être constitués que par des apoenzymes protéiques. Le métal ne joue probablement pas alors le rôle catalytique correspondant à celui tenu dans les oxydases par Cu ou Mn dont le caractère d'oxydabilité répond à la fonction même de l'enzyme. Dans les phosphatases comme dans les autres enzymes à métal dissociable, ce dernier ne sert vraisemblablement qu'à fixer le substrat par la formation d'un complexe Apoenzyme-métal-substrat, ce qui serait en accord avec le caractère banal des cations et avec les possibilités de combinaison de ceux-ci avec le substrat. Si l'on définit comme coferment une molécule qui porte les groupements actifs directement responsables de la catalyse, ce terme ne s'applique probablement pas aux constituants métalliques des phosphatases. Il semble utile de souligner dès à présent une confusion tendant à identifier la nature d'un groupement prosthétique avec la fonction d'un coferment, confusion qui risque de faire perdre de vue le mécanisme de la spécificité enzymatique.

2. La nature protéino métallique des phosphatases explique également l'existence de plusieurs pH optima. En effet le constituant métallique peut former avec les apoenzymes plusieurs types de complexes dont la stabilité dépend étroitement du pH. Leur dissociation à certaine concentration en ions H^+ permet ainsi de conserver sélectivement un seul de ces complexes et de le caractériser. Mais elle ne se produit que lentement par action prolongée de certaine acidité. L'interprétation courante des courbes d'activité phosphatasique en fonction du pH, attribuant l'existence des pH optima à une rapide dissociation des phosphatases n'est pas compatible avec les énormes inégalités observées dans les vitesses de dissociation et de recombinaison des constituants enzymatiques. L'allure de ces courbes traduit le fait

que les dérivés phosphoriques, possédant plusieurs degrés d'ionisation, forment avec l'enzyme plusieurs combinaisons dont la dissociation détermine la situation du pH optimum.

Il est logique de supposer que le mécanisme et la capacité de combinaison de l'apoenzyme avec les divers cations ne sont pas les mêmes en milieu alcalin et en milieu acide, l'ionisation des groupements carboxyles prédominant dans le premier cas, et celle des groupements aminés dans le second. L'augmentation de la concentration en cations n'influence pas l'enzyme de la même manière ; selon le degré de saturation de ce dernier en groupements métalliques fonctionnels et selon ses possibilités de combinaison, des complexes nouveaux, d'activités inégales, prendront naissance. L'inhibition de la phosphatase « acide » par un métal activateur de la phosphatase « alcaline » ne signifie pas que les groupements fonctionnels sont différents dans les deux cas ; elle peut exprimer plus simplement une absence des conditions optima d'activation dans le premier. La stabilité particulière de la phosphatase « acide », confirmée par sa résistance à la dialyse et à l'action des formateurs de complexe, semble prouver qu'à l'état naturel cet enzyme doit être saturé en groupements métalliques ; l'augmentation de la concentration en cations peut, par fixation anarchique de métaux, provoquer la formation de nouveaux complexes moins actifs. Au contraire, au pH de l'eau distillée employée (6,4), la phosphatase « alcaline » résiste beaucoup moins bien à la dialyse et aux formateurs de complexe ; plus apte à la dissociation, elle ne doit pas, au moment de l'extraction, être saturée en cations ; elle se montrera, par conséquent, plus activable par ceux-ci.

3. L'activation d'un enzyme insuffisamment purifié est toujours ardue en raison de l'intervention imprévisible d'effecteurs étrangers et de l'impossibilité de réaliser les conditions optima de l'activation en milieu incomplètement défini. Ainsi l'influence exercée par les métaux inclus dans l'apoenzyme et les ballastes protéiques qui l'accompagnent dans les diverses préparations a fait attribuer une grosse importance à la distinction des lyo et desmo enzymes. En réalité la séparation de ces derniers repose sur l'élimination insuffisante d'effecteurs naturels. De même les contradictions soulevées par l'action de certains cations sur les phosphatases proviennent souvent de l'absence de coactivateurs dont nous avons souligné le rôle à la fois dans le domaine des phosphatases et dans celui d'un certain nombre d'autres.

En résumé la variabilité des caractères des phosphatases selon leur origine vis-à-vis du substrat, du pH, des effecteurs, pa-

raît au premier abord très grande. En fait les écarts observés s'expliquent par le jeu des équilibres enzymatiques ; ils sont basés sur la stabilité des holophosphatases, celle des complexes protéino métalliques, celle des combinaisons Enzyme-substrat et sur l'action d'effecteurs naturels minéraux ou organiques, sur ces divers complexes.

RÉSUMÉ.

Notre travail comprend deux parties : l'une théorique, destinée à élargir la définition classique de la spécificité enzymatique, l'autre expérimentale portant sur la caractérisation des phosphatases.

PREMIÈRE PARTIE.

CHAPITRE I. — *Expressions générales de la spécificité enzymatique.* — La définition classique de la spécificité des enzymes vis-à-vis de leurs substrats, est trop étroite. Elle ne fait pas suffisamment ressortir les modifications dues à l'influence du pH et aux conditions d'action des effecteurs. Nous avons essayé de relier la spécificité des enzymes au jeu des trois équilibres.

(1) Apoenzyme + Coenzyme $\rightleftarrows$ Enzyme

(2) Holoenzyme + Substrat $\rightleftarrows$ Enzyme-Substrat

(3) Enzyme-Substrat $\rightleftarrows$ Enzyme + constituants s + s'.

Ceux-ci constituent l'expression générale de la spécificité enzymatique et définissent les relations de l'enzyme à l'égard du substrat, du pH et des effecteurs.

A. Vis-à-vis du substrat, la spécificité est conditionnée à la fois par l'affinité de l'enzyme pour ce dernier, par la vitesse et le mode de dislocation du composé soumis à la catalyse enzymatique. L'examen du rôle de l'apoenzyme et du coenzyme dans le déterminisme de la spécificité nous a conduit à supposer que dans le groupe des enzymes à coferments métalliques, exceptées les oxydases, le métal ne participe probablement pas à l'activité catalytique mais à la fixation du substrat sur l'enzyme.

B. L'enzyme est ensuite défini par un pH optimum lequel régit les trois équilibres précédents. Les variations du pH optimum s'expliquent par les variations et l'action, en fonction du pH, des effecteurs sur les conditions générales des équilibres enzymatiques.

C. Le rôle des effecteurs est de favoriser le déplacement de ces équilibres vers la droite (activateurs), de le gêner ou de le

paralyser (inhibiteurs). Ce mécanisme d'action qui permet d'expliquer de nombreux faits de spécificité enzymatique, semble d'ailleurs être commun à d'autres phénomènes biologiques. L'examen d'un ensemble de travaux nous a en outre conduits à poser à nouveau le problème de la spécificité des lyo et desmo-enzymes et à discuter le rôle des coactivateurs.

Chapitre II. — *Spécificité des phosphatases.* — Conformément aux principes généraux exposés dans le premier chapitre, nous avons essayé de coordonner de nombreux faits établis sur les phosphatases.

Etudiant les rapports entre la spécificité de ces enzymes et la constitution du substrat nous avons observé que l'alcool, le phénol ou l'amine liés au reste phosphorique ont une influence nulle ou très faible sur le comportement de l'enzyme ; la présence d'un ou de plusieurs radicaux phosphoriques, servant sans doute à la fixation du substrat sur l'enzyme, détermine au contraire la spécificité des phosphomonoestérases, des pyro, poly et méta-phosphatases. Cependant la séparation et l'isolement de ces diverses phosphatases n'ont pas été réalisés d'une façon satisfaisante, en dehors du travail de Bailey, sur la pyrophosphatase de levure.

Le pH exerce aussi une influence décisive sur la spécificité des phosphatases et permet la distinction de diverses phosphatases isodynames (« très acides », « peu acides », « alcalines »). Cependant une certaine confusion règne dans la classification de celles-ci car, dans leur individualisation, on n'a pas suffisamment tenu compte des causes d'altération des pH optima.

Enfin l'étude des effecteurs des phosphatases met en évidence la participation de certains métaux à l'activité de celles-ci. Leur inactivation au moyen des formateurs de complexes et leur réactivation par des cations sont en faveur de cette conception. Toutefois l'inhibition des phosphatases « acides » par des cations, les travaux d'Albers sur les conditions de réactivation des phosphatases « acides » et « alcalines », obligent à un nouvel examen des conditions optima d'activation et d'inhibition, nécessaires à une individualisation nette des phosphatases.

Deuxième partie.

Recherches personnelles.

Chapitre I. — *Séparation des phosphomonoestérases et des pyrophosphatases. — Leur isolement.* — 1). Nous avons appliqué en premier lieu des techniques d'adsorption (adsorption sur kaolin à pH = 4,5 ; adsorption sur alumine précipitée directement dans le milieu étudié à pH = 6,8) à la séparation des phosphomonoestérases et des pyrophosphatases dans des matériels biologiques qui n'ont pas été étudiés jusqu'à présent à ce point de vue. Nous avons séparé ainsi les phosphomonoestérases et les pyrophosphatases « acides » de divers Basidiomycètes, des hématies.

2). L'inactivation spécifique à divers pH permet également de détruire sélectivement toute activité phosphomonoestérasique dans les extraits de Basidiomycètes, de levure basse, de foie, et d'obtenir des préparations uniquement actives sur les pyrophosphates minéraux.

3). Enfin le fractionnement au moyen de l'alcool ou de l'acétone à partir de certains autolysats (types Albers) permet de pousser très loin la purification ; il fournit des solutions enzymatiques qui, après cristallisation, donnent une phosphomonoestérase « alcaline » pratiquement exempte de pyrophosphatases.

La spécificité des phosphomonoestérases et des pyrophosphatases est ainsi matérialisée par l'existence de protéines enzymatiques différentes, et dans une certaine mesure, par le degré de stabilité des complexes holoenzymatiques.

4). Quant à la spécificité fine des phosphomonoestérases vis-à-vis des α et β-glycérophosphates et des pyrophosphates à l'égard des pyrophosphates minéraux et organiques, elle ne constitue pas un caractère propre de l'enzyme. Nous avons obtenu des préparations de champignons hydrolysant préférentiellement tantôt l'isomère α et tantôt le β, les variations observées n'étant pas le fait de l'enzyme ou de l'origine biologique de ce dernier mais des techniques de préparation adoptées. Il a été montré en outre que la décomposition des pyrophosphates organiques requiert la présence d'une phosphomonoestérase qui hydrolyse l'ester orthomonophosphorique libéré par la pyrophosphatase ; la présence d'un activateur spécifique n'est pas prouvée.

Chapitre II. — *Le pH et les phosphatases.* — En cherchant à mettre en évidence des systèmes phosphatasiques qui n'ont pas été étudiés ou qui l'ont été incomplètement dans certains tissus : Basidiomycètes, hématies, graines de soja et d'amande douce, organes animaux (foie, rein, intestin), nous avons essayé de dégager la signification générale des courbes d'activité en fonction du pH.

1). Nous avons observé ainsi que l'absence présumée de plusieurs enzymes dans certains tissus est souvent due à la présence d'inhibiteurs naturels. L'élimination de ces derniers soit par adsorption sur kaolin ou sur alumine (Basidiomycètes, soja), soit par autolyse (amandes douces) nous a permis de mettre en évidence pour la première fois l'existence des phosphomonoestérases « très acides » et « acides » dans les Basidiomycètes et dans des organes de végétaux verts réputés dépourvus de phosphomonoestérases « très acides ».

2). Nous avons en outre démontré l'action de divers artefacts qui peuvent altérer les pH optima des phosphatases. Ce sont l'effet conjugué de deux phosphatases à des pH situés à la limite d'action des deux enzymes et simulant un faux pH optimum, le collage des protéines enzymatiques à des impuretés protéiques entraînant des pertes d'activité (hématies), la libération d'inhibiteurs par des processus d'autolyse (champignons), l'élimination des activateurs spécifiques au cours de la purification (foie). L'élimination de ces divers artefacts, l'emploi d'activateurs ou d'inhibiteurs spécifiques (couple cystéine-Fe_{II}, Mg^{++}), la régularisation des conditions d'autolyse, nous a permis de mettre en évidence un système phosphatasique « acide » complet (phosphomonoestérases et pyrophosphatases « très acides » et « peu acides ») dans les hématies, un système pyrophosphatasique complet (enzymes « très acides », « acides », « alcalins »), dans le foie, l'intestin et le rein.

3). La signification générale des courbes d'activité phosphatasique en fonction du pH ne doit pas être recherchée dans la dissociation des phosphatases à certains pH comme le laissent supposer les récents travaux d'Albers ; l'existence de plusieurs pH optima s'explique plutôt par la formation de différents complexes Enzyme-substrat dont chacun possède une constante de dissociation correspondant à un degré d'ionisation du dérivé phosphorique.

La comparaison des vitesses de dissociation et de reconstitution des phosphatases « acides » ou « alcalines » révèle en effet que les premières sont très lentes par rapport aux secondes.

Dans les conditions habituelles de préparation des enzymes ou d'hydrolyse cette dissociation est trop faible pour influencer d'une façon sensible la courbe d'activité phosphatasique en fonction du pH.

4). Grâce à des dialyses prolongées à pH = 7,8 des phosphatases « acides », à pH = 5,6 - 5,8 des phosphatases « alcalines », nous avons inactivé la phosphomonoestérase « très acide » de levure et la phosphomonoestérase « alcaline » d'intestin, par dissociation de ces enzymes en leurs constituants. La recombinaison de l'apoenzyme avec le coenzyme permet la restauration de l'activité enzymatique. La réactivation est partielle dans le cas de la levure ; elle est totale dans le cas de l'intestin.

Chapitre III. — *Effecteurs des phosphatases.* — L'individualisation des phosphatases au moyen d'effecteurs spécifiques, exige au préalable une définition précise des conditions d'activation et d'inhibition.

I. Sur l'existence réelle des lyo et desmo-phosphatases :

1. Nous avons établi l'influence de certains produits d'autolyse dialysables dont la présence conditionne les caractères d'activation de la phosphomonoestérase « acide » des préparations hépatiques.

2. La sensibilité de la phosphomonoestérase « alcaline » d'intestin à Ca, Mg, Mn, Fe, Zn très faible avant dialyse, est accrue après dialyse, surtout en présence de formateurs de complexes ; après dialyse contre des solutions salines très diluées de Ca + Mg + Mn + Fe + Zn, les préparations enzymatiques deviennent insensibles aux cations ou acquièrent même la tendance à être inhibées par certains d'entre eux (Ca, Fe, Zn).

3. Il existe vis-à-vis de la phosphomonoestérase « alcaline » une très forte concurrence entre les divers cations et surtout entre Fe, d'une part et Mg, Mn, Ca d'autre part. De très faibles concentrations de Fe et Zn réduisent l'activation de l'enzyme par Ca, Mg, Mn, l'effet concurrent était d'autant plus accentué que la phosphatase est davantage saturée en cations activateurs.

4. La phosphomonoestérase « alcaline » présente dans les extraits aqueux ou ammoniacaux (lyoenzyme) ou dans les résidus d'extraction insolubles (desmoenzyme) est inégalement sensible à l'activation par Ca, Mg, Mn au début de la dialyse ; après dialyse prolongée (15 jours à 37°) la sensibilité aux divers cations

devient identique. Aucune différence d'activation ne permet de distinguer les diverses fractions lyo et desmo-enzymatique dont l'existence présumée tient moins à une réelle spécificité qu'à une élimination insuffisante d'effecteurs naturels.

II. Sur la coactivation.

1. Il a été mis en évidence l'existence d'un couple coactivateur (cystéine-Fe_{II}) de la pyrophosphatase « alcaline » de foie de Chien. La spécificité de ce couple semble être assez étroite : il est sans action sur les autres phosphatases, comme sur les pyrophosphatases « alcalines », provenant d'autres origines biologiques ; en outre le remplacement de Fe_{II} par un autre métal ou de la cystéine par un autre thiol reste inefficace.

2. Des couples acides aminés (alanine, cystéine, acide aspartique)— Mg se sont montrés de puisssants activateurs de la phosphomonoestérase « alcaline ».

3. Nous avons établi des conditions nouvelles d'hydrolyse qui permettent à l'alanine de coactiver énergiquement l'action de Ca, Mg, Fe, Zn, Mn sur la phosphomonoestérase « alcaline ».

III. Interchangeabilité des cations activateurs.

1. L'activation des phosphatases « alcalines » par Ca, Mg, étant bien connue, nous avons cherché à établir leur efficacité vis-à-vis des phosphatases « acides ». Mg se montre un inhibiteur puissant et spécifique des extraits aqueux de champignons, de soja, à pH compris entre 3,2 et 4,5. Mg^{++} diminue l'affinité de la phosphatase « acide » pour le substrat tout en se révélant anti-inhibiteur des ions $PO^{\equiv}_4$ et $AsO^{\equiv}_4$. Nous avons établi ensuite qu'une dialyse prolongée (deux mois à 37°) des préparations purifiées de Basidiomycètes fournit des préparations qui ne sont plus inhibées par Mg. Nous avons préparé en outre des préparations d'amande douce qui sont fortement activées à pH = 3,6-4,3 par Mg. et Ca. Phosphatases « alcalines » et « acides » se comportent ainsi de façon semblable vis-à-vis des cations ; les différences dans le pourcentage d'activation tiennent sans doute à la stabilité des complexes protéino-métalliques en milieu acide et alcalin et au degré de saturation de ces complexes en cations au moment de l'extraction et de la préparation de l'enzyme.

2. Après avoir montré que les phosphomonoestérases peuvent être inhibées par Fe et Zn au contraire des pyrophosphatases qui sont activées par ces cations, comme par Ca, Mg, Mn, nous avons ensuite défini des conditions d'hydrolyse (présence des

coactivateurs, incubation au pH optimum) qui permettent de démontrer que les deux enzymes sont également activés par Ca, Mg, Mn, Fe, Zn.

Divers cations divalents exercent ainsi le même effet sur diverses phosphatases « alcalines » et « acides ». Leur interchangeabilité ainsi que la participation des coactivateurs à l'activité des phosphatases semblent prouver que les cations n'interviennent pas directement dans la catalyse, mais dans la fixation du substrat sur l'enzyme.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abderhalden (E.). — *Biochem. Ztschr.*, 1941, **308**, 439.
2. Abderhalden (E.) et Ehrenwald (E. v.). — *Fermentfchg.*, 1931, **12**, 411.
3. Abdon (N. O.) et Nielsen (N. A.). — *Skand. Arch. Physiol.*, 1938, **78**, 13.
4. Albers (D.). — *H. S. Ztschr. f. physiol., Chem.*, 1939, **261**, 43.
5. Albers (D.). — *Id.*, 1939, **261**, 269.
6. Albers (D.). — *Id.*, 1940, **265**, 129.
7. Albers (D.). — *Id.*, 1940, **266**, 1.
8. Albers (D.). — *Biochem. Ztschr.*, 1940, **306**, 143.
9. Albers (H.). — *Ztschr. f. Angew. Chem.*, 1936, **49**, 194.
10. Albers (H.). — *in Hd. d. Enzymol. de F. F. Nord et Weidengagen.* R., Leipzig, 1940, I.
11. Albers (H.) et Albers (E.). — *H. S. Ztschr. f. physiol., chem.*, 1935, **235**, 47.
12. Albers (H.) et Albers (E.). — *Id.*, 1935, **232**, 165.
13. Albers (H.) et Albers (E.). — *Id.*, 1935, **232**, 189.
14. Albers (H.), Beyer (E.), Bohnenkamp (A.) et Müller (G.). — *Ber. d. dtsch. Chem. Gesellsch.*, 1938, **71**, 1913.
15. Ammon (R.). — *In Hd. d. Enzymol., de F. F. Nord et Weidenhagen R.*, Leipzig, 1940, **1**, 350.
16. Ammon (R.) et Geissler. — *Biochem. Ztschr.*, 1932, **249**, 475.
17. Anderson (R. K.) et Squires (R. B.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1938, **124**, 71.
18. Armstrong (E. F.). — *Proc. Roy. Soc.*, 1904, **73** (16) 516.
19. Armstrong (E. F.) — *Id*, 1905, **76**, (13) 592.
20. Asakawa (K.). — *Journ. of Biochem.*, Japan, 1928, **10**, 157.
21. Asakawa (K.). — *Id.*, 1929, 11, 143, 155 et 599.
22. Auhagen et Grzycki. — *Biochem. Ztschr.*, 1933, **265**, 217.
23. Baer (E.) et Fischer (O. L.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1940, **135**, 34 et 321.
24. Bailey (K.) et Webb (E. C.). — *Biochem. Journ.*, 1944, **38**, 394.
25. Bakwin (H.) et Bodansky (O.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1933, **101**, 641.
26. Bamann (E.). — *Ber. d. dtsch. Chem. Gesellsch.*, 1929, **62**, 1538.
27. Bamann (E.). — *H. S. Ztschr. f. Angew. Chem.*, 1939, **52**, 186.
28. Bamann (E). — *Naturw.* 1940, **28**, 142.
29. Bamann (E.) et Diederichs (K.). — *Ber. d. dtsch. Chem. Gesellsch.*, 1934, **67**, 2019.
30. Bamann (E.) et Diederichs (R.). — *Id.*, 1935, **68**, 6.
31. Bamann (E.) et Gall (H.). — *Biochem. Ztschr.*, 1937, **293**, 1.
32. Bamann (E.), et Heumüller (E.). — *Naturw.*, 1940, **28**, 535.
33. Bamann (E.) et Laeverenz. — *Ber. d. dtsch. Chem. Gesellsch.*, 1931, **64**, 857.
34. Bamann (E.) et Laeverenz. — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1933, **215**, 121.
35. Bamann (E.) et Laeverenz. — *Id.*, 1934, **213**, 185.
36. Bamann (E.) et Meisenheimer (M.). — *Ber. d. dtschr. Chem. Gesellsch.*, 1938, **71**, 1711, 1980, 2086 et 2233.

37. Bamann (E.) et Meisenheimer (M.). — *In Methoden der Fermentfchg., de* Bamann (E.) et Myrbäck (K.). — Leipzig, 1942, II.
38. Bamann (E.) et Rendlen (E.). — *H. S. Ztschr. f. physiol., Chem.*, 1936, 238, 133.
39. Bamann (E.) et Riedel (E.). — *Id.*, 1934, 229, 125.
40. Bamann (E.), Riedel (E.) et Diederichs (K.). — *Id.*, 1934, 230, 175.
41. Bamann (E.) et Salzer (W.). — *Biochem. Ztschr.*, 1936, 286, 143.
42. Bamann (E.) et Salzer (W.). — *Id.*, 1936, 286, 147.
43. Bamann (E.) et Salzer (W.). — *Id.*, 1936, 286, 380.
44. Bamann (E.) et Salzer (W.). — *Id.*, 1937, 288, 299.
45. Bamann (E.) et Salzer (W.). — *Ber. d. dtsch. Chem. Gesellsch.*, 1937, 70, 1263.
46. Bamann (E.) et Salzer (W.). — *Ergebn. d. Enzymf.*, 1938, 7, 46.
47. Bamann (E.) et Schimke (O). — *Biochem. Ztschr.*, 1941, 308, 130, 310, 119 et 131.
48. Bamann (E.) et Schmeller. — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1930, 188, 251 et 1931, 194, 14.
49. Bamann (E.), Schweizer et Schmeller. — *Id.*, 1933, 222, 121.
50. Baranowski (P.). — *Enzymol.*, 1938, 5, 262.
51. Barrenscheen (H. K.), Banga (I.) et Braun (K.). — *Biochem. Ztschr.*, 1933, 265, 148.
52. Barrenscheen (H. K.) et Beneschowsky. — *Id.*, 1933, 265, 159 et 1935, 276, 147.
53. Barrenscheen (H. K.) et Lang (S.). — *Id.*, 1932, 253, 395.
54. Barrenscheen (H. K.) et Iachimowitz (Th.). — *Id.*, 1937, 292, 350.
55. Bauer (E.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1934, 225, 245.
56. Bauer (E.). — *Id.*, 1936, 239, 195.
57. Bauer (E.). — *Id.*, 1936, 242, 29.
58. Bauer (E.). — *Id.*, 1937, 248, 213.
59. Bauer (E.) et Fischer (O. L.). — *Journ. of biol. chem.*, 1940, 135, 34 et 321.
60. Bayliss (W. M.). — *Journ. of Physiol.*, 1913, 46, 230.
61. Behrend (N.). — *Biochem. Ztschr.*, 1933, 260, 490.
62. Belfanti (S.), Contardi (A.) et Ercoli (A.). — *Ergebn. d. Enzymf.*, 1936, 5, 213.
63. Belfanti (S.)., Contardi (A.) et Ercoli (A.). — *Biochem. Journ.*, 1935, 29, 517, 842 ey 1491.
64. Berger (J.) et Johnson (M. J.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1940, 133, 157.
65. Berger (J.), Johnson (M. J.) et Baumann (C. A.). — *Journ. of biol. chem.*, 1941, 137, 389.
66. Bergmann (M.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1935, 111, 225.
67. Bergmann (M.). — *Id.*, 1937, 119, 35.
68 Bergmann (M.) et Zervas (L.). — *H. S. Ztschr. f. physiol., chem.*, 1934, 224, 11.
69. Bersin (Th.). — *In Hd. d. Enzymol. de Nord F. F. et Weidenhagen R., Leipzig*, 1940, 1. 154.
70. Bersin (Th.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. chem.*, 1933, 222, 177.
71. Bersin (Th.) — *Ergebn d. Enzymf.*, 1935, 4, 68.
72. Bersin (Th.) et Köster. — *H. S. Ztschr. f. physiol. chem.*, 1935, 233, 59.
73. Bersin (Th.) et Logeman. — *Id.*, 1933, 220, 209.
74. Bertrand (G.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1897, 124, 1032 et *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1897, 17, 619.
75. Blagowetschenski. — *Biochem. Ztschr.*, 1934, 270, 341.
76. Bodansky (O.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1933, 101, 93 ; 1936, 114, 273 et 115, 101.
77. Bodansky (O.) et Bakwin (H.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1934, 104, 747.
78. Bourquelot (E.). — *Journ. Pharm.*, 1914, 10, 361 et 393.

79. Bourquelot (E.) et Bridel (M.). — *Journ. Pharm.*, 1912, 5, 569 et 6, 5-6 ; *Ann. de Chim.*, 1913, 29, 145 ; *C. R. Acad. Sc.*, 1911, 152, 1060.
80. Bourquelot (E.) et Coine. — *Journ. Pharm.*, 1913, 7, 236.
81. Bourquelot (E.) et Verdon. — *Id.*, 1913, 7, 377 et 575.
82. Bowers (R. V.), Outhouse (E. L.) et Forbes (J. C.). — *Journ. of biol. Chem.* 1940, 132, 675.
83. Bredereck (H.), Benchelt et Richter. — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1936, 244, 102.
84. Bredereck (H.), Caro et Richter. — *Ber. d. dtsch. chem. Gesellsch.*, 1938, 71, 2389.
85. Bredereck (H.) et Geyer (E.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1939, 254, 233.
86. Bredereck (H.) et Müller. — *Bed. d. dtsch. chem. Gesellsch.*, 1939, 72, 1429.
87. Bridel (M.) et Joanid. — *Journ. Pharm.*, 1930, 12, 337.
88. Brücke. — *Biochem. Ztschr.*, 1932, 253, 470.
89. Buston. — *Biochem. Journ.*, 1931, 25, 1671 et 27, 1859.
90. Butenandt (A.). — *Ztschr. f. Angew. Chem.*, 1941, 54, 89.
91. Butenandt (A.), Weidel (W.), Weichert (R.) et Derjugin (W. v.). *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1943, 279, 27.
92. Cattaneo (C.), Gabbrielli (M. C.) et Scoz (G.). — *Enzymol.*, 1937, 2, 17.
93. Cedrangolo (F.) et Del Regno (F.). — *Archiv. d. Sci. Biol.*, 1938, 24, 91.
94. Cedrangolo (F.) et Ruffo (A.). — *Id.*, 1938, 24, 59.
95. Cloetens (R.). — *Enzymol.*, 1939, 7, 157 et 333.
96. Cloetens (R.). — *Naturw.*, 1939, 27, 806 et 1940, 28, 252.
97. Cloetens (R.). — *Biochem. Ztschr.*, 1941, 310, 42; 307, 253 et 308, 37.
98. Colowick (S. P.) et Kalckar (H. M.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1941, 137, 789.
99. Colowick (S. P.), Welch (M. S.) et Cori (C. F.). — *Id.*, 1940, 133, 359 et 641.
100. Contardi (A.) et Ercoli (A.). — *Biochem. Ztschr.* 1933, 261, 275.
101. Contardi (A.), Ravazzioni (C.) et Osella (L.). — *Enzymol.*, 1937, 3, 170.
102. Cori (G. T.) et Cori (C. F.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1939, 131, 397 et 1940, 135, 733.
103. Cori (G. T.), Colowick (S. P.) et Cori (C. F.). — *Id.*, 1939, 127, 771.
104. Courtois (J.). — *Th. doc. Sc.* Paris, 1938.
105. Courtois (J.). — *Enzymol.*, 1938, 5, 273.
106. Courtois (J.). — *Id.*, 1939, 6, 342.
107. Courtois (J.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1938, 20, 1359 et 1376.
108. Courtois (J.). — *Journ. Pharm. Chim.*, 1939, 29, 433.
109. Courtois (J.) et Denis (P.). — *Enzymol.*, 1938, 5, 288 et 1939, 6, 325.
110. Courtois (J.) et Manouvrier (J.). — *Id.*, 1939, 6, 325 et 242.
111. Covella (M.). — *Ann. Chim. applicata*, 1939, 29, 12.
112. Croft Hill. — *Journ. Chem. Soc.*, London, 1898, 73, 634.
113. Dakin (H. D.). — *Journ. of Physiol.*, 1903, 30, 253.
114. Davies (D. R.). — *Biochem. Journ.*, 1934, 18, 529.
115. Dawson (E. R.). — *Id.*, 1927, 21, 398.
116. Del Regno (F.). — *Archiv. d. Sc. Biol.*, 1938, 24, 532.
117. Demuth (F.). — *Biochem. Ztschr.*, 1935, 159, 415 et 166, 162.
118. Deutsch. — *H. S. Ztschr. f. physiol., Chem*, 1921, 171, 264.
119. Deutsch et Röster. — *Id.*, 1927, 171, 264 et 1929, 185, 146.
120. Dubois (K. P.) et Potter (V. R.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1943, 148, 451.
121. Duclaux (E.). — *Traité de microbiologie*, Paris, 1898, I.

122. Eakin (R. E.), Mc Kinley (W. A.) et Williams (R. J.). — *Science*, 1940, 92, 224.
123. Eakin (R. E.), Snell (E. E.) et Williams (R. J.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1940, 136, 801 et 1941, 140, 535.
124. Edlbacher (S.) et Bauer (E.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1938, 254, 275.
125. Edlbacher (S.) et Kutscher (W.). — *Id.*, 1932, 207, 1.
126. Edlbacher (S.) et Pinösch. — *Id.*, 1937, 250, 241.
127. Edlbacher (S.) et Zeller. — *Id.*, 1936, 242, 253 et 245, 65.
128. Eisenbrand (J.) et Scienz (M.). — *Id.*, 1941, 268, 1.
129. Eisenbrand (J.) et Wegel (F.). — *id.*, 1941, 268, 26.
130. Engelhardt (W. A.) et Ljubimowa. — *Nature*, 1939, 144, 668.
131. Erdtmann (H.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1927, 172, 182 et 1928, 177, 211.
132. Euler (H. v.). — *Id.*, 1911, 74, 13.
133. Euler (H. v.). — *Id.*, 1914, 92, 292.
134. Euler (H. v.). — *Id.*, 1935, 233, 120.
Euler (H. v.) et Adler. — *Id.*, 1935, 232, 122.
135. Euler (H. v.) et Ahlström (L.). — *Id.*, 1943, 279, 175.
136. Euler (H. v.), Karrer (P.) et Zchender (E.). — *Helv. Chim. Acta*, 1934, 17, 157.
137. Euler (H. v.) et Küllberg (S.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1911, 74, 15.
138. Euler (H. v.) et Larsson. — *Ark. Kem. Mineral. Geol.*, 1934, 11, A, 1.
139. Euler (H. v.) et Nilsson. — *H. S. Ztschr. f. physiol., Chem.*, 1926, 162, 264.
140. Euler (H. v.) et Vestin (R.). — *Naturw.*, 1937, 25, 416.
141. Euler (H. v.), Wolf (A.) et Hellström (H.). — *Ber. d. dtsch. Chem. Gelsellsch.*, 1929, 62, 745.
142. Falconer (R.), Gulland (J. M.), Hodday (G. I.) et Jackson (E. M.). — *Journ. Chem. Soc.*, London, 1939, 907.
143. Falkenhausen. — *Biochem. Ztschr.*, 1931, 253, 151.
144. Ferdmann (P.) et Feinschmidt. — *Id.*, 1935, 277, 203.
145. Fischer (E.). — *Ber d. dtsch. Chem. Gesellsch.*, 1894, 27, 2985.
146. Fischer (F. G.) — *Ztschr f angew. Chem.*, 1940, 53, 461 et 1940, 53, 1661.
147. Fleischhacker (H. H.). — *Journ. ment. Sci.*, 1939, 84, 947.
148. Fleury (P.) et Courtois (J.). — *Enzymol*, 1938, 5, 254.
149. Fodor (A.) et Frankenthal (L.). — *Biochem. Ztschr.*, 1930, 228, 101 et 229, 16.
150. Folley (S. J.) et Kay (H. D.). — *Biochem. Journ.*, 1935, 29, 1387.
151. Folley (S. J.) et Kay (H. D.). — *Ergebn. d. Enzymf.*, 1936, 5, 159.
152. Francioli (M). — *Enzymol.*, 1937, 3, 200.
153. Franke (W.). — *Ztschr. f. angew. Chem.*, 1940, 53, 580 et *in Hd. d. Enzymol., de Nord F. F. et Weidenhagen R.* Leipzig, 1940, H.
154. Fromageot (C. L.). — *Ergbn. d'enzymf.*, 1938, 7, 51.
155. Fruton (J. S.) et Bergmann (M.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1940, 133, 153.
156. Gesellschaft f. chem. Ind. in Basel, D. R. P. 687-197-148. — *Chem. Centrbl*, 1940, 1, 2507.
157. Giri (K. V.). — *Biochem. Ztschr.*, 1936, 285, 306.
158. Giri (K. V) — *H S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1937, 245, 185.
159. Giri (K. V.). — *Id.*, 1938, 254, 117.
160. Giri (K. V) — *Id.*, 1938, 254, 126.
161. Giri (K. V.). — *Biochem. Journ.*, 1939, 33, 309.
162. Giri (K. V.) et Datta (N. C.) — *Id.*, 1936, 30, 1089.
163. Glock (G. E.), Murray (M. M.) et Pincus (P.). — *Id.*, 1938, 32, 2096.
164. Grant. — *Id.*, 1935, 19, 1905.

165. Grassmann (W.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. chem.*, 1930, 186, 183.
166. Grassmann (W.). — *Ztschr. f. angew. Chem.*, 1931, 44, 105.
167. Grassmann (W.) — *Ergebn. d. Enzymf.*, 1931, 1, 129.
168. Grassmann (W.) et Dyckerhoff (H.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1928, 175, 18 et 179, 41.
169. Grassmann (W.) et Kleuk (L.). — *Id.*, 1929, 186, 26.
170. Grassmann (W.), Klenk (L.) et Peters-Mayr (T.). — *Id.*, 1935, 280, 307.
171. Grassmann (W.) et Schneider (P.). — *Ergebn. d. Enzymf.*, 1936, 5, 79.
172. Grassmann (W.) et Schoenebeck. — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1930, 194, 124.
173. Grassmann (W.), Volmer et Windbichler. — *Biochem. Ztschr.*, 1938, 298, 8.
174. Green (D.), Herbert et Subrachmangan. — *Journ. of biol. Chem.*, 1940, 135, 79.
175. Greville. — *Biochem. Journ.*, 1936, 30, 877 et 31, 2274.
176. Gualdi. — *Biochem. Ztschr.*, 1929, 205, 320.
177. Gulland (J. M.) et Jackson (E. M.). — *Biochem. Journ.*, 1938, 32, 590.
178. Gulland (J. M.) et Jackson (E. M.). — *Journ. Chem. Soc.*, London, 1938, 1492 et 1939, 1842
179. Gutman (A. B.) et Gutman (E. B.). — *Proc. Soc. Exp. Biol., Med.*, 1938, 38, 470.
180. György (P.), Rose (C. S.), Eakin (R. E.), Snell (E. E.) et Williams (R. J.). — *Science*, 1941, 93, 477.
181. György (P.) et Rose (C. S.). — *Id.*, 1941, 94, 261.
182. Haase (A.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1936, 239, 1.
183. Haldane. — *Enzymes, Longmans, Green et C°*, London, 1930.
184. Hanes. — *Biochem. Journ.*, 1935, 19. 2588.
185. Hanriot (M.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1901, 132, 146 et 212.
186. Hanske (W.). — *Ztschr. f. angew. Chem.*, 1941, 54, 357.
187. Hashimoto (K.). — *Journ. of Biochem.*, Japan, 1937, 26, 137.
188. Haurowitz (F.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 144, 68.
189. Heard (R. D. H.) et Wynne (A. M.). — *Biochem. Journ.*, 1933, 27, 1655 et 1938, 32, 563.
190. Hedin (S. G.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1925, 146, 122 1926, 154, 252.
191. Helferich (B.). — *Ergeb. d. Enzymf.*, 1938, 7, 83 et 1943, 9, 71.
192. Helferich (B.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1923, 128, 99.
193. Helferich (B.) et Vorsatz. — *Id.*, 1936, 239, 241.
194. Hellerman (L.). — *Physiol. Rev.*, 1937, 17, 454.
195. Hellermann (L.) et Perkins (M. E.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1934, 107, 241.
196. Hellerman (L.) et Perkins (M. E.). — *Id.*, 1935, 112, 175.
197. Herken (H.), Schmitz (A.) et Merten (R.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. chem.*, 1942, 275, 29.
198. Hitlcock (D. I.). — *Journ. amer. chem. Soc.*, 1926, 68, 2870.
199. Holmberg (C. G.). — *Biochem. Ztschr.*, 1935, 279, 145.
200. Hommerberg (C.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1929, 185, 123.
201. Hommerberg (C.). — *Biochem. Ztschr.*, 1933, 258, 155.
202. Hommerberg (C.). — *Svensk. kem. Tidschr.*, 1935, 47, 63.
203. Hopkins et Morgan. — *Biochem. Journ.*, 1936, 30, 1446.
204. Horii (W.). — *Journ. of biochem., Japan*, 1932, 16, 433.
205. Horiuchi. — *Id.*, 1931, 14, 463.
206. Hotta. — *Id.*, 1934, 20, 343.
207. Hove (E.). Elvehjem (C. A.) et Hart (E. B.). — *Journ. of biol. chem.*, 1940, 134, 425.
208. Hudson (C. S.) et Paine (H. S.). — *Journ. Amer. chem. Soc.*, 1910, 32, 1350.

209. Hyde et Lewis. — *Journ. of biol. chem.*, 1921, 47, 495.
210. Ichihara (M.). — *Journ. of Biochem.*, Jajan, 1933, 18, 87.
211. Ignaticef (V.) et Wasteneys (H.). — *Biochem. Journ.*, 1936, 30, 1171.
212. Inouye (K.). — *Journ. of biochem.*, Japan, 1928, 10, 133.
213. Itoh (R.). — *Id.*, 1936, 23, 299.
214. Itoh (R.) et Nakamura (T.). — *Id.*, 1937, 26, 187.
215. Itoh (R.) et Obo (F.). — *Id.*, 1939, 30, 277.
216. Itoh (R.), Kayashima (S.) et Fujimi (K.). — *Id.*, 1939, 30, 283.
217. Iwatsuru. — *Biochem. Ztschr.*, 1926, 173, 348.
218. Jacobsen (E.). — *Id.*, 1931, 242, 292 ; 1932, 249, 21 ; 1933, 263, 302 et 267, 89.
219. Jacobsohn (K. P.) et Pereira (F. B.). — *C. R. Soc. biol.*, 1931, 107, 1170.
220. Jacobsohn (K. P.) et Tapadinhas (J.). — *C. R. soc. biol.*, 1930, 104, 432 et 135, 152.
221. Jacobsohn (K. P.) et Tapadinhas (J.). — *Biochem. Ztschr.*, 1931, 230, 304.
222. Jenner (H. D.) et Kay (H. D.). — *Journ. of biol. chem.*, 1931, 93, 733.
223. Josephson (K.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. chem.*, 1924, 134, 50.
224. Josephson (K.). — *Id.*, 1925, 147, 1 et 155.
225. Karrer (P.) et Zehender (F.). — *Helv. chim. Acta*, 1933, 16, 701.
226. Kastle (J. H.). — *Amer. Chem. Journ.*, 1902, 27, 481.
227. Kastle (J. H.) et Loevenhardt (A. S.). — *Amer. Chem. Journ.*, 1900, 24, 491.
228. Kay (H. D.). — *Biochem. Journ.*, 1926, 20, 791.
229. Kay (H. D.). — *Id.*, 1928, 22, 855.
230. Kay (H. D.). — *Id.*, 1928, 22, 1446.
231. Kay (H. D.). — *Journ. chem. Soc. London*, 1929, 524.
232. Kay (H. D.). — *Journ of biol. chem.*, 1930, 89, 235.
233. Kay (H. D.) et Lee (E. R.) — *Id.*, 1931, 91, 135.
234. Kayashima (S.). — *Journ. of Biochem.*, Japan, 1938, 28, 175.
235. Keilin (D.) et Mann (T.). — *Nature*, 1939, 144, 242.
236. Kiese (M.) et Hastings (A. B.). — *Science*, 1938, 88, 242.
237. Kiessling (W.). — *Biochem. Ztschr.*, 1939, 144, 442.
238. King (E. J.). — *Biochem. Journ.*, 1931, 25, 799.
239. King (E. J.) et Armstrong (A. R.). — *Journ. Can. Med. Assoc.*, 1934, 31, 376.
240. King (E. J.) et Delory (E. J.). — *Biochem. Journ.*, 1938, 32, 1157.
241. King (E. J.) et Nicholson — *Id.*, 1939, 33, 1182.
242. King (H.), King (E. J.) et Page (J. H.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1930, 191, 243.
243. Kitasato. — *Biochem. Ztschr.*, 1928, 197, 257 et 201, 206.
244. Klein (W.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1932, 207, 125.
245. Klein (W.). — *Id.*, 1933, 218, 164.
246. Klein (W.). — *Id.*, 1935, 231, 125.
247. Klein (W.). — *Id.*, 1935, 235, 246.
248. Klein (W.) et Malamani (V.). — *Id.*, 1939, 259, 263.
249. Klein (W.) et Rossi. — *Id.*, 1935, 231, 104.
250. Knoevenagel (C.). — *Biochem. Ztschr.*, 1940, 305, 337.
251. Kobayashi (H.). — *Journ. of Biochem.*, Japan, 1927, 8, 205 ; 1928, 10, 147 et 1936, 24, 369.
252. Kossel (A. J.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1942, 276, 251.
253. Köster (H.) et Bersin (Th.). — *Id.*, 1935, 231, 153.
254. Kotkowa (K. I.). — *Chem. Centrbl.*, 1940, II, 2625.
255. Krähling et Weber (H. H.). — *Biochem. Ztschr.*, 1938, 298, 227.
256. Kraut (H.) et Borkowski. — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1933, 220, 192.
257. Kraut (H.) et Pantschenko-Jurewics (W.). — *Biochem. Ztschr.*, 1934, 275, 114.

258. Krebs (H. A.). — *Id.*, 1930, 220, 289 et 1931, 238, 174.
259. Kübowitz (F.). — *Id.*, 1937, 292, 221.
260. Kübowitz (F.) et Lüttgens. — *Id.*, 1941, 307, 170.
261. Kühn (R.) — *H. S. Ztschr. f. physiol. chem.*, 1924, 135, 1.
262. Kühn (R.). — *Id.*, 1923, 129, 57.
263. Kühn (R.). — *Ztschr. f. angew. chem.*, 1940, 53, 1.
264. Kühn (R.). — *Id.*, 1942, 55, 1.
265. Kühn (R.). — *Congrès du Palais de la Découverte.* VII. *Biologie, Hermann*, Paris, 1938.
266. Kühn (R.) et Desnuelle (P.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1938, 251, 23.
267. Kurata (K.). — *Journ. of biochem. Japan*, 1931, 14, 24.
268. Kuroya. — *Biochem. Ztschr.*, 1930, 225, 452.
269. Kutscher (W.). — *Ztschr. f. angew. Chem.*, 1939, 52, 466.
270. Kutscher (W.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. chem.*, 1938, 257, 1.
271. Kutscher (W.) et Pany (J).. — *Id.*, 1938, 255, 169.
272. Kutscher (W.) et Wörner (A.). — *Id.*, 1936, 238, 275 et 239, 109.
273. Kutscher (W.) et Wüst (H.). — *Id.*, 1942, 273, 235 ;
274. Kutscher (W.) et Wüst (H.). — *Biochem. Ztschr.*, 1942, 310, 293.
275. Lacassagne (A.), Buu-Hoi et Cagniant (P.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1944, 138, 16.
276. Landsteiner et Sheer (V. D.). — *Journ. exp. med.*, 1932, 55, 784 et 1934, 59, 769.
277. Lang (K.) et Mayer (H.). — *H. S. Ztschr. f. physiol Chem.*, 1939, 261, 249
278. Langenbeck (W.). — *in Hd. d. Enzymol., de Nord F. F. et Weidenhagen R.*. Leipzig, 1940.
279. Le Breton (E.) et Pantaléon (J.). — *C. R. Soc. biol.*, 1944, 138, 20 et 30.
280. Lennerstrand (A.) et Lennerstrand (M.). — *Ark. kem. Miner. Geol.*, 1939, 13, 13.
281. Levene et Dillon. — *Journ. of biol. chem.*, 1930, 88, 763 et 1932, 96, 461.
282. Liebnecht (W. L.). — *Biochem. Ztschr.*, 1939, 303, 96.
283. Lipton (M. A.) et Elvehjem (C. A.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1940, 136, 637.
284. Lohmann (K.). — *Biochem. Ztschr.*, 1933, 262, 157.
285. Lohmann (K.) et Jendrassi (K. L.). — *Id.*, 1926, 178, 419.
286. Lohmann (K.) et Schuster (Ph.). — *Id.*, 1937, 294, 188.
287. Lundsteen (E.). — *Enzymol.*, 1938, 5, 383.
288. Lundsteen (E.) et Vermehren (M.). — *Id.*, 1939, 6, 27.
289. Mc Ginty et Lewis. — *Journ. of biol. chem.*, 1926, 67, 567.
290. Main (R. K.) et Schmidt (C. L. A.). — *Journ. gen. physiol.*, 1936, 19, 127.
291. Manaka. — *Journ. of Biochem., Japan*, 1931, 14, 191 et 481.
292. Marrack (J.). — *Ergebn. d. Enzymf.*, 1938, 7, 281.
293. Martland (M.) et Robison (R.). — *Biochem. Journ.*, 1927, 21, 665 et 1929, 21, 665.
294. Maschmann (E.). — *Biochem. Ztschr.*, 1938, 300, 89 ; 1939, 302, 332 ; 1940, 307, 1 ; 1941, 309, 179 et 310, 28.
295. Maschmann (E.) et Helmert (E.). — *Id.*, 1935, 277, 97 et 111 ; 280, 185.
296. Maschmann (E.) et Helmert (E.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1933, 219, 99; 222, 207 et 214 ; 1934, 223, 117 et 224, 56.
297. Massart (L.) et Dufait (R.). — *Naturw.*, 1939, 27, 806.
298. Massart (L.) et Dufait (R.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. chem.*, 1942, 272, 157.
299. Massart (L.) et Wandendriesche (L.). — *Naturw.*, 1940, 28, 143.
300. Mayr et Borger. — *Biochem. Ztschr.*, 1934, 273, 56.
301. Mayer (K.) et Mayer (M. K.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 267, 115.

302. Melnik (D.) et Field (H. Jr.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1939, 127, 531.
303. Mendel et Blood. — *Id.*, 1910, 8, 177.
304. Merten (R.), Schmitz (A.) et Herken (A.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1942, 275, 53.
305. Meunier (P.) et Mentzer (C.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, 25, 80.
306. Meunier (P.), Mentzer (C.), Buu-Hoi et Cagniant (P.). — *Id.*, 1943, 25, 384.
307. Michaelis (L.) et Dadidsohn (H.). — *Biochem. Ztschr.*, 1911, 35, 386.
308. Michaelis (L.) et Menten (M. L.). — *Id.*, 1913, 49, 333.
309. Michaelis (L.) et Pechstein (H.). — *Id.*, 1913, 53, 320.
310. Michaelis (L.) et Rona (P.). — *Id.*, 1913, 57, 70.
311. Michaelis (L.) et Stern (K. G.). — *Id.*, 1931, 240, 192.
312. Micheel (F.). — *Ztschr. f. angew. Chem.*, 1941, 54, 293.
313. Minniti (G.). — *Bioch. Terap. speriment.*, 1939, 26, 417.
314. Müller (J.). — *Nederl. Tijdschr. Geneeskunde*, 1940, 84, 2431 *in Chem. Centrbl.*, 1940, II, 1447.
315. Munemura (S.). — *Journ. of Biochem.*, Japan, 1933, 17, 343.
316. Murray (D. R. P.). — *Biochem. Journ.*. 1929, 23, 292.
317. Murray (D. R. P.) et King (E. J.). — *Id.*, 1930, 24, 190.
318. Myrbäck (K). — *H. S. Ztschr. f. Physiol. Chem.*, 1926, 158, 160 et 159, 1
319. Nagai (J.). — *Journ. of Biochem.*, Japan, 1939, 30, 225.
320. Nakamura (T.). — *Chem. Centrbl.*, 1940, 1, 3543.
321. Needham (D. M.). — *Enzymol.*, 1938, 5, 158.
322. Nelson (J. M.) et Bloomfield (G.). — *Journ. amer. Chem. Soc.*, 1924, 46, 1025.
323. Nemec (A.). — *Biochem. Ztschr.*, 1923, 137, 570 et 1928, 202, 229.
324. Neuberg (C.). — *Biochem. Ztschr.*, 1927, 188, 227 et 189, 498.
325. Neuberg (C.) et Fischer (H. A.). — *Enzymol.*, 1937. 2, 191.
326. Neuberg (C.) et Fischer (H. A.). — *Id.*, 1937, 2, 241.
327. Neuberg (C.) et Fischer (H. A.). — *Id.*, 1937, 2, 360.
328. Neuberg (C.), Jacobsohn (K. P.). — *Biochem. Ztschr.*, 1928, 199, 498.
329. Neuberg (C.), Jacobsohn (K. P.) et Wagner (J.). — *Id.*, 1927, 188, 227.
330. Neuberg (C.) et Leibowitz (J.). — *Id.*, 1928, 191, 460.
331. Neuberg (C.) et Schuchardt (W.). — *Enzymol.*, 1936. 1, 39.
332. Neuberg (C.) et Wagner (J.). — *Biochem. Ztschr.*, 1926, 171, 485.
333. Northrop (J. H.). — *Journ. gener. physiol.*, 1922, 1, 487 ; 1924, 5, 263 et 1925, 7, 603.
334. Noyes et Falk. — *Journ. of biol. chem.*, 1923, 55, 653.
335. Ochiai (E.). — *Biochem. Ztschr.*, 1932, 253, 185.
336. Ohmiya (S.). — *Journ. of biochem.*, Japan, 1933, 18, 125.
337. Ohmori (Y.) — *Enzymol.*, 1937, 4, 217.
338. Oppenheimer (C.). *Die Fermente und ihre Wirkungen*, 1925 et suppl., 1935.
339. Oppenheimer (C.). — *Chemische Grundlagen der Lebensvorgänge*, Leipzig, 1933. p. 151.
340. Ostern (P.), Terzakowéc (J.) et St Hubl. — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1938, 255, 109.
341. Pantschenko-Jurewics (W.) et Kraut (H.). — *Biochem. Ztschr.*, 1936, 285, 407.
342. Parnas (J. K.). — *Enzymol.*, 1938. 5, 166.
343. Pasteur (L.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1858. 46. 615.
344. Patwardhan. — *Biochem. Journ.*, 1937, 31. 560.
345. Pennington (D.), Snell (E. E.) et Eakin (R. E.). — *Journ. amer. chem. Soc.*, 1942. 64, 469.
346. Perkins (M.) et Hellermann (L.). — *Id.*, 1936, 58, 2654.

347. Pett (L. B.) et Wynne (A. M.). — *Biochem. Journ.*, 1933, 27, 1660 et 1665.
348. Pett (L. B.) et Wynne (A. M.). — *Id.*, 1934, 28, 365.
349. Pett (L. B.) et Wynne (A. B.). — *Id.*, 1938, 32, 563.
350. Pfandkuch (E.). — *H. S. Ztschr. f. Physiol. Chem.*, 1936, 241, 34.
351. Pillai (R. K.). — *Biochem. Journ.*, 1938, 32, 1087.
352. Platt (S. B.) et Dawson (E. R.). — *Biochem. Journ.*, 1925, 19, 860.
353. Pottevin (H.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1906, 20, 901.
354. Pratesi (P.). — *Enzymol.*, 1937, 4, 242.
355. Pringsheim (H.) et Beiser (A.). — *Biochem. Ztschr.*, 1924, 148, 336.
356. Pringsheim (H.) et Leibowitz (J.). — *Ber. d. dtsch. Chem. Gesellsch.*, 1924, 57, 1576.
357. Pringsheim (H.) et Loew (F.). — *Bull. soc. chim. biol.*, 1935, 2, 1607.
358. Purr (A.). — *Biochem. Journ.*, 1935, 29, 13.
359. Pyle (J. J.), Fischer (J. H.) et Clark (R. H.). — *Journ. of biol. chem.*, 1937, 129, 283.
360. Rabaté (J.) et Courtois (J.). — *Bull. soc. chim. biol.*, 1941, 13, 184 et 190.
361. Rapkine. — *Biochem. Journ.*, 1938, 52, 1729.
362. Rapoport (S.), Leva (E.) et Guest (G. M.). — *Journ. of biol. chem.*, 1941, 139, 621.
363. Ravazoni (C.) et Brunetto (G.). — *Chem. Centrbl.*, 1942, 1, 1394.
364. Reiss (J.). — *Enzymol.*, 1939, 5, 251.
365. Reiss (P.). — *Bull. soc. chim. biol.*, 1934, 16, 385.
366. Reiss (P.). — *Th. Doct. Sc., Clermont-Ferrand*, 1942.
367. Robison (R.). — *Biochem. Journ.*, 1923, 17, 287.
368. Robison (R.) et Joames. — *Id.*, 1924, 18, 740.
369. Roche (J.). — *Id.*, 1931, 25, 1724.
370. Roche (J.) et Bullinger (E.). — *Enzymol.*, 1939, 7, 278 ; *C. R. Soc. biol.*, 1938, 127, 1271.
371. Roche (J.) et Derrien (Y.). — *Bull. soc. chim biol.*, 1940, 22, 7.
372. Roche (J.) et Latreille (M.). — *C. R. Soc. biol.*, 1935, 118, 900 ; 1937, 125, 472 et *Enzymol.*, 1937, 3, 75.
373. Rockwood (E.). — *Journ. amer. chem. soc.*, 1924, 46, 1641.
374. Rockwood (E. V.) et Husa (W. S.). — *Journ. amer. Chem. Soc.*, 1923, 45, 1678.
375. Rona (P.) et Ammon (R.). — *Ergebn. d. enzymf.*, 1933, 2, 50.
376. Rona (P.) et Bloch (E.). — *Biochem. Ztschr.*, 1921, 118, 185.
377. Rona (P.) van Eweyck (C.) et Tennenbaum (M.). — *Id.*, 1924, 144, 490.
378. Rondoni et Pozzi (L.). — *H. S. Ztschr. f. Physiol. Chem.*, 1933, 219, 22.
379. Rosenthaler (L.). — *Biochem. Ztschr.*, 1908, 14, 238 ; 1909, 17, 257 et 1913, 50, 486.
380. Rotini (O. F.) et Neuberg (C.). — *Id.*, 1935, 279, 453.
381. Rudy (H.). — *H. S. Ztschr. f. Physiol. Chem.*, 1936, 242, 198.
382. Sadamitsu (R.). — *Journ. of Biochem.* Japan, 1937, 26, 341.
383. Samec (M.). — *Ergebn. d. Enzymf.* 1943, 9, 89.
384. Satoh (T.). — *Journ. of Biochem.* Japan, 1935, 21, 19.
385. Schäffner (A.) et Bauer (E.). — *H. S. Ztschr. f. Physiol., Chem.*, 1934, 225, 245.
386. Schäffner (A.) et Bauer (E.). — *Id.*, 1935, 232, 64.
387. Schäffner (A.) et Bauer (E.). — *Id.*, 1935, 232, 66.
388. Schäffner (A.) et Bauer (E.). — *Id.*, 1937, 248, 159.
389. Schäffner (A.) et Bauer (E.). — *Naturw.*, 1933, 22, 464.
390. Schäffner (A.) et Berl (H.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1936, 238. 111.
391. Schäfnner (A.), Berl (H.) et Bauer (E.). — *Id.*, 1935, 234, 146.

392. Schäffner (A.) et Krumey (F.). — *Id.*, 1936, **243**, 149.
393. Schäffner (A.) et Krumey (F.). — *Id.*, 1938, **255**, 145.
394. Schramm (G.) et Wolf (A.). — *Id.*, 1940, **263**, 73.
395. Schmidt. — *Id.*, 1932, **208**, 185.
396. Schmidt (G.), Pickels (E. G.) et Levene (P. A.). — *Journ. of Biol. chem.*, 1939, **127**, 251.
397. Schmidt (G.) et Tannhauser (S. J.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1943, **149**, 369.
398. Schuchardt (W.). — *Biochem. Ztschr.*, 1935, **278**, 164 ; 1936, **283**, 433 et **285**, 448.
399. Schürmeyer (A.). — *Pflüg. Archiv.*, 1925, **208**, 595 et **210**, 755.
400. Severi (R.). — *Chem. Centrbl.*, 1940, 1, 1511.
401. Shermann (H. C.) et Caldwell (M. L.). — *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1922, 44, 2926.
402. Shermann (H. C.) et Nayler (M. N.). — *Id.*, 1922, 44, 2957.
403. Shermann (H. C.) et Walter (E.). — *Id.*, 1923, **45**, 1960.
404. Silverman et Wertman. — *Enzymol.*, 1939, 5, 385.
405. Sizer (J. W.). — *Journ. of Biol. Chem.*, 1942, **145**, 405.
406. Sörensen (S. P. L.). — *Biochem. Ztschr.*, 1909, **21**, 131.
407. Sperry (W. M.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1935, **111**, 467.
408. Sperry (W. M.) et Brand (F.). — *Id.*, 1941, **137**, 377.
409. Stern (K. G.). — *H. S. Ztschr. f. Physiol. Chem.*, 1932, **209**, 176.
410. Stern (K. G.) et Hofer (J. W.). — *Enzymol.*, 1937, **3**, 82.
411. Stedman. — *Biochem. Journ.*, 1931, **25**, 1147.
412. Sumner (J. B.) et Hand (D. B.). — *Journ. of biol. chem.*, 1928, **76**, 149.
413. Suzuki. — Cité dans Folley et Kay (150).
414. Takahashi (H.). — *Journ. of Biochem.*, Japan, 1932, **16**, 447 et 463.
415. Takakazu (S.). — *Id.*, 1939, **29**, 289.
416. Tannhauser (S. J.), Reichel (M.) et Grattan (J. F.). — *Journ. of biol. chem.*, 1937, **121**, 697.
417. Tannhauser (S. J.), Reichel (M.), Grattan (J. F.) et Maddock. — *Journ. of biol. chem.*, 1937, **121**, 709 715, 721, 727 et 1938, **124**, 631.
418. Tapadinhas (J.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **105**, 811.
419. Tauber. — *Journ. of biol. Chem.*, 1938, **125**, 191.
420. Tauber. — *Journ. amer. chem. soc.*, 1938, **60**, 730.
421. Theorell (H.). — *Biochem. Ztschr.*, 1934, **272**, 155 ; 1935, **278**, 263.
422. Thoai (Ng. v.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 467.
423. Thoai (Ng. v.). — *Id.*, 1943, **137**, 767.
424. Thoai (Ng. v.). — *Id.*, 1944, **38**, 521.
425. Thoai (Ng. v.), Roche (J.) et Danzas (E.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, **26**, 1139 et 1945, sous presse.
426. Thoai (Ng. v.), Roche (J.) et Danzas (E.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1945, sous presse
427. Tofte. — *Biochem. Zeitschr.*, 1934, **272**, 308.
428. Udagawa (H.). — *Journ. of. Biochem.*, 1935, **22**, 323.
429. Uzawa (S.). — *Id.*, 1932, 15, 1, 15 et 19.
430. du Vigneaud (V.), Dittmer (K.), Hofmann (K.) et Melville (D.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1942, **50**, 374.
431. Voegtlin (O.). — *Science*, 1933, **77**, 92.
432. Zsigmondy. — *Ztschr. analyt. chem.*, 1901, **40**, 697.
433. Waelsch et Busztin. — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1937, **249**, 135.
434. Waldschmidt-Leitz (E.). — *Journ. soc. Chem. Ind.*, 1936, **55**, 620 ; *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1925, **142**, 217.
435. Waldschmidt-Leitz (E.) et Köhler (F.). — *Biochem. Ztschr.*, 1933, **258**, 360.
436. Waldschmidt-Leitz (E.) et Mayer (K.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1935, **236**, 168.

437. Waldschmidt-Leitz (E.), Samec (M.) et Mayer (K.). — *Id.*, 1937, 250, 192.
438. Waldschmit-Leitz (E.), Scharikowa (A.) et Schäffner (A.). — *Id.*, 1933, 214, 75.
439. Warburg (O.). — *Ueber die katalytischen Wirkungen der lebenden subztanz*, Berlin, 1928.
440. Warburg (O.). — *Biochem. Ztschr.*, 1927, 198, 355 et 214, 5.
441. Warburg (O.) et Christian (W.). — *Id.*, 1934, 275, 212.
442. Warburg (O.) et Christian (W.). — *Id.*, 1941, 310, 384.
443. Warburg (O.) et Christian (W.). — *Id.*, 1943, 314, 149.
444. Weber (H. H.) et Ammon (R.). — *Id.*, 1929, 204, 197.
445. Weber (H. H.) et Gesenius (H.). — *Id.*, 1927, 187, 410.
446. Weidenhagen (A.). — *In Hd. d. Enzymol., de Nord F. F. et Weidenhagen R.*, Leipzig, 1940, 1, 512.
447. Werkman (C. H.), Stone (R. W.) et Wood (H. G.). — *Enzymol.*, 1937, 4, 24.
448. Westenbrin (K. H. G.), Dorp (D. A. V.), Gruber (M.) et Weldman (H.). — *Id.*, 1940, 9, 673.
449. Westphal (O.). — *In Hd. d. Enzymol., de Nord F. F. et Weidenhagen R*, Leipzig, 1940, 11, 1129.
450. Wiese (A. C.), Johnson (B. C.), Elvehjem (C. A.), Hart (E. B.), et Halpin (J. G.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1939, 127, 411.
451. Wlliams (H. L.). — *Biochem. Journ.* 1934, 28, 1887.
452. Williams (H. L.) et Watson (M.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1940, 135, 337.
454. Willstätter (R.) et Grassmann (W.). — *Id.*, 1924, 128, 184 et 1926, 153, 25.
455. Willstätter (R.), Grassmann (W.) et Ambros (O.). — *Id.*, 1926, 151, 286 et 307.
456. Willstätter (R.), Kuhn (R.) et Bamann (E.). — *Ber. d. dtsch. Chem. Gesellsch.*, 1928, 61, 886.
457. Willstätter (R.) et Memmen (R.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1923, 129, 1 et 133, 247, 1924, 138, 216.
458. Willstätter (R.) et Rohdewald (M.). — *Id.*, 1933, 221, 13 et 1934, 229, 241.
459. Willstätter (R.) et Rohdewald (M.). — *Enzymol.*, 1936, 1, 213.
460. Willstätter (R.), Waldschmidt-Leitz (E.) et Memmen (F.). — *H. S. Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1923, 125, 93.

TABLE DES MATIÈRES.

Pages

PREMIÈRE PARTIE.

Aperçu critique sur la conception actuelle de la spécificité dans le domaine de l'enzymologie 7

INTRODUCTION 9

Chapitre I. — *Expressions générales de la spécificité enzymatique* 12

I. — Spécificité enzymatique et constitution des substrats 12

A. Aspects divers du problème 13

B. Facteurs cinétiques composant la spécificité enzymatique 16

C. Rôle des constituants de l'enzyme dans la spécificité 19

Conclusions 23

II. — Spécificité enzymatique et pH 24

A. Le pH et la dissociation de l'enzyme .. 24

B. Le pH et la dissociation électrolytique du substrat 25

C. Le pH et la combinaison Enzyme-substrat 25

D. Facteurs modifiant le pH optimum 26

Conclusions 26

III. — Spécificité enzymatique à l'égard des effecteurs 27

A. Lyo- et desmo enzymes 28

B. Inhibiteurs 29

C. Activateurs 34

D. Coactivateurs 37

E. Désactivateurs. Désinhibiteurs 39

Conclusions 40

Chapitre II. — *Spécificité des phosphatases* 42

I. — Spécificité des phosphatases à l'égard des divers dérivés phosphoriques 43

A. Premier facteur de spécificité : influence de l'alcool ou du phénol liés au reste phosphorique 44

Pages

B. Deuxième facteur de spécificité : influence des groupements aminés unis au reste acide 47
C. Troisième facteur de spécificité : influence des oxhydriles phosphoriques.... 48
Conclusions 52

II. — pH optimum d'hydrolyse phosphatasique..... 53
A. Individualité des phosphatases « isodynames » 54
B. Action du pH sur les phosphatases.... 56
C. Facteurs modifiant le pH optimum.... 58
Conclusions 59

III. — Effecteurs des phosphatases 59
A. Inhibiteurs 59
B. Activateurs 64

IV. — Spécificité et constitution des phosphatases... 69

DEUXIÈME PARTIE.

Recherches personnelles sur la chimie des phosphatases..... 71

OBJET DES RECHERCHES ET PLAN GÉNÉRAL DU TRAVAIL..... 73

Chapitre I. — *Séparation des phosphomonoestérases et des pyrophosphatases. Leur isolement* 75
I. — Méthodes d'adsorption 76
A. Basidiomycètes 76
B. Hématies 78
C. Discussion des résultats 80
II. — Méthodes de dialyse au pH de dissociation des phosphatases 80
A. Matériel d'étude et technique..... 80
B. Séparation des pyrophosphatases..... 81
C. Discussion des résultats 82
III. — Fractionnement au moyen de solvants organiques. Cristallisation 83
A. Matériel d'étude et technique 84
B. Isolement de la phosphomonoestérase « alcaline » 85
C. Discussion des résultats 86
IV. — Spécificité des phosphomonoestérases et des pyrophosphatases 86
A. Spécificité des phosphomonoestérases vis-à-vis des α et β glycérophosphates.... 86

Pages

B. Spécificité des pyrophosphatases vis-à-vis des pyrophosphates minéraux et organiques 88
Conclusions 89

Chapitre II. — *Le pH et les phosphatases* 91

II. — Les pH optima des phosphatases. Leurs variations (signification générale des courbes d'activité en fonction du pH 92

A. Basidiomycètes 92
B. Végétaux verts 102
C. Hématies 108
D. Organes animaux : foie, rein, intestin.. 111
Conclusions 112

II. — Influence des pH sur la stabilité des phosphatases 114

A. Dissociation et reconstitution des phosphomonoestérases « très acides » 114
B. Dissociation et reconstitution de la phosphomonoestérase « alcaline » 116
Conclusions 117

Conclusions 118

Chapitre III. — *Effecteurs des phosphatases* 120

I. — Etat de l'enzyme et degré de sensibilité aux effecteurs. Sur l'existence réelle des lyo- et desmophosphatases 120

A. Action des cations sur diverses préparations de phosphomonoestérase « acide » du foie 121
B. Action des cations sur diverses préparations de phosphomonoestérase « alcaline » dialysées dans des conditions diverses 122
C. Action concurrente des cations sur la phosphomonoestérase « alcaline » 125
D. Sensibilité aux effecteurs de diverses préparations phosphatasiques, en fonction du temps de dialyse 127
Conclusions 131

II. — Sur la coactivation 131

A. Action du couple cystéine-Fe_{II} sur la pyrophosphatase « alcaline » 132
B. Action des couples acides aminés — Mg sur la phosphomonoestérase « alcaline » 138
C. Action des couples alanine-métaux sur la phosphomonoestérase « alcaline » ... 140
Conclusions 141

Pages

III. — Interchangeabilité des cations activateurs..... 142

A. Action des cations sur les phosphatases « acides » et « alcalines »..... 142

B. Action des cations sur les phosphomonoestérases et les pyrophosphatases..... 150

Conclusions 152

Conclusions générales. La spécificité des phosphatases dans le cadre général de l'enzymologie..... 155

Résumé 159

Bibliographie 167

SECONDE THÈSE

Propositions données par la Faculté :

1° Les pigments floraux.

2° Aspects physico-chimiques de la génétique.

Vu et permis d'imprimer :
Aix-en-Provence, le 25 juillet 1945.
Le Recteur,
GAU.

Vu et approuvé :
Marseille, le 23 juillet 1945.
Le Doyen,
E. TRAYNARD.

M. DECLUME IMPRIMEUR, LONS-LE-SAUNIER (31.2160).
Février 1946. « Dépôt légal 1er trimestre 1946 », N° 3603 (2290-45-200).